

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET ENVIRONNEMENTS

SPÉCIALITÉ
Géochimie et écotoxicologie

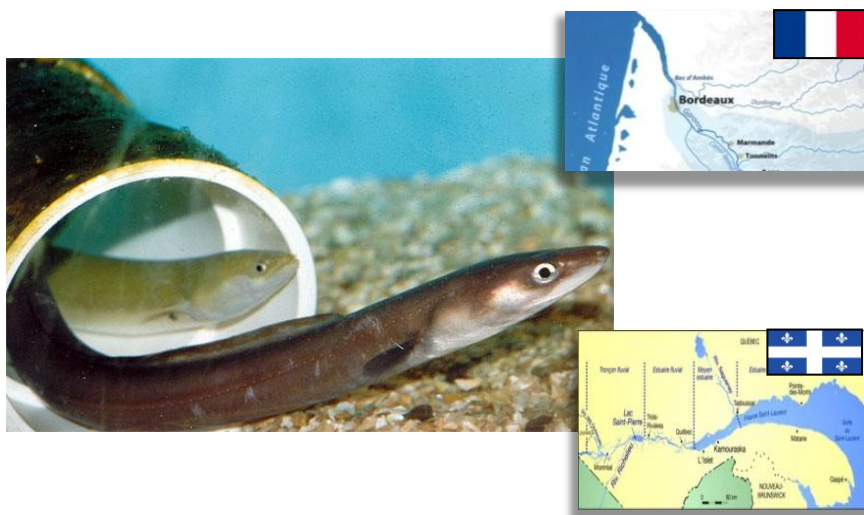
**Étude de l'impact des contaminants métalliques et organiques
chez l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) et américaine
(*Anguilla rostrata*) au moyen d'approches transcriptomiques**

Sous la direction de :

Magalie Baudrimont, Fabien Pierron et Louis Bernatchez

Par **Lucie Baillon**

Soutenue le 10 Février 2015



THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET ENVIRONNEMENTS

SPÉCIALITÉ
Géochimie et écotoxicologie

**Étude de l'impact des contaminants métalliques et organiques
chez l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) et américaine
(*Anguilla rostrata*) au moyen d'approches transcriptomiques**

Sous la direction de :

Magalie Baudrimont, Fabien Pierron et Louis Bernatchez

Par **Lucie Baillon**

Soutenue le 10 Février 2015

Après avis de :

M. Geffard Alain, Professeur, Université de Reims Champagne Ardenne
M. Kestemont Patrick, Professeur, Université de Namur

Rapporteur
Rapporteur

Membres du jury :

M. Cachot Jérôme, Professeur, Université de Bordeaux
M. Geffard Alain, Professeur, Université de Reims Champagne Ardenne
M. Kestemont Patrick, Professeur, Université de Namur
M. Reynaud Stéphane, Maître de conférences, Université de Grenoble
Mme. Baudrimont Magalie, Professeur, Université de Bordeaux
M. Louis Bernatchez, Professeur, Université Laval
M. Pierron Fabien, Chargé de recherche, Université de Bordeaux

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directrice de thèse
Directeur de thèse
Responsable scientifique

Remerciements

Si pour l'écriture de la thèse j'ai refreiné mes phrases de 20 mètres de long, je crois que la page des remerciements est exempte de l'exercice difficile de l'écriture scientifique...alors ici j'oublie le POURQUOI et COMMENT et je remercie toutes les personnes qui m'ont permis la réalisation de ce beau projet !

Je remercie en premier lieu les professeurs Antoine Grémare et Frédéric Garabetian qui m'ont accueillie au sein du laboratoire EPOC et de la Station Marine d'Arcachon.

Je tiens à remercier également Jean-Charles Massabuau pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je tiens à vous présenter mes excuses pour vous avoir empêché de travailler durant les trajets de train du retour...

Je remercie Alain Geffard et Patrick Kestemont d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Je remercie également Stéphane Reynaud et Jérôme Cachot d'avoir évalué cette thèse.

Un grand merci aussi à Magalie Baudrimont, Louis Bernatchez et Fabien Pierron de m'avoir confié ce projet, vous m'avez donné cette chance et j'espère avoir été à la hauteur ! Louis, merci pour ton accueil à Québec, Magalie, bien que débordée de travail tu as su me donner de bons conseils et je t'en remercie. Fabien, ces trois ans n'ont pas été très facile mais j'ai beaucoup appris à tes côtés. Je n'oublierai jamais ni le pourquoi, ni le comment, ni le s'étendre sans se répandre ou encore le « the dilution is the solution ». Merci pour ton sacrifice du lit à Saint Seurin, tu as subis le supplice des ressorts à ma place ! Merci pour ton aide tout au long de ces trois ans entre les galères de puces et d'anguilles, la peinture à faire sur les murs de la salle de manip et j'en oublie beaucoup...Merci aussi de m'avoir appris certains mots en Québécois, fort de ton expérience la bas. J'ai été ta première thésarde, j'espère que je ne t'aurais pas (trop) traumatisé, bref Merci pour tout docteur Pierron !

Tient oui au sujet de l'équipe ! Je pense particulièrement à Régine et Agnès, mes deux mamans du labo, qui savent se faire entendre quand elles sont là ! Je n'oublierais jamais votre gentillesse et votre écoute durant ces trois années, un grand Merci à vous deux !

Je pense aussi à la team « biomol » Patrice et Cerise, Patrice, fournisseur officiel en chocolat le midi, pour m'avoir dit que mes puces étaient trop vertes et Cerise pour m'avoir prêté tes

cours sur les puces à ADN (que j'ai toujours au fait..) quand je commençais à désespérer de réussir un jour à mettre au point ce protocole des pupuces !

Bruno ! Pardon de t'avoir charrié avec ton bras cassé, ton cœur cassé, ton pied cassé...en fait comment arrives-tu à rester encore debout ? Merci pour tes coups de main dans ma salle de manip « guiguilles » et pour m'avoir fait bien rire aussi durant ces trois ans !

Une grande pensée à Henry et Christian aussi, les deux hommes multifonctions de la station Marine et mes fournisseurs en collier et serre collier, pinces, marteau, scie, ponceuse, colle, aiguiseur à couteaux et pour votre invitation à manger des frites et les vives façons meunières ! Merci de m'avoir ouvert votre atelier quand j'en avais assez de faire le tour du bâtiment...en fait non pas le tour...mes 8000 tours par jour plutôt ! Henry, j'espère que ta petite Lucie ne deviendra pas comme moi !

Christelle...invariablement là chaque matin pour l'accueil à l'entrée avec ton invariable cigarette et ton café...sans toi je crois que j'en serais encore à faire des filets de vives au couteau ! C'est tellement mieux de passer un poisson entier à la broyeuse ! C'est rigolo !!

Florence, ma Florence ! Dois-je faire la liste de l'ensemble de tes coups de mains ? Je vais essayer : trouver du matériel en tout genre, éponger l'eau dans ma salle de manip, sécher mon jean en venant au boulot trempée à cause de la pluie, chauffer de l'eau pour mon petit thé, me prêter ton épaule dans les moments difficiles, ranger mon bazar, retrouver mes trucs perdu, de m'écrire des petits mots d'encouragements, me faire penser à des choses importantes à faire, etc., derrière ton fort caractère se cache une personne avec un grand cœur et je te remercie de m'avoir accompagné durant ces trois ! Ouf dans quelques semaines tu vas être enfin débarrassé de moi, plus de cheveux roux partout et de râlage à tout va ! Je te souhaite d'avancer tranquillement vers une retraite bien méritée et de profiter de tes petits enfants !

En parlant de retraite...cela me fait penser à Cathy ! Et oui tu n'as pas eu la patience d'attendre la fin de ma thèse pour partir en retraite...c'est pas super cool !! J'espère que tu t'y plairas bien quand même et que tu viendras pour ma fin à moi !! Merci pour ta gentillesse ma Cathy !

Mais oui j'oubliais la team « molluscan eyes » ! Alias Jean-Charles, Momo, Damien et Laura. Momo, Merci pour ton aide en stat, toi le dieu du « R ». Tu auras intérêt à me faire une démonstration de Zouk le jour de ma soutenance car pour le moment ça n'a été que des promesses ! J'espère aussi que tu retrouveras très vite ton épouse et te souhaite un bon vent

ici...ou ailleurs ! Damien, merci pour tes râleries et tes entrées fracassantes quotidienne depuis plus d'un an dans mon aquarium...tout ça pour me piquer mes gâteaux !! Bon et pour venir discuter science avec Laura aussi... Et tient oui Laura, nouvelle thésarde depuis un an, c'est avec émotion que je vais arrêter d'être ta colloc de bureau snif...tu es une personne vraiment à connaître et je te remercie pour ta gentillesse, ton attention et ton humour ! Ça a été une belle année en ta compagnie et je te souhaite le meilleur pour la suite ! Je sais que tu feras une bonne chercheuse quoique tu en pense et garde précieusement ton côté « humain », c'est le plus essentiel !

Je pense aussi à Piwi, le Breton perdu en Gironde, fidèle au poste depuis mon arrivée ici, devenu le pro de l'ICP avec un emploi du temps de Maître de conf...jamais là quoi ! Soit disant tu « travaillerais » sur Talence aussi...Merci pour tes nombreux coups de main en phase de dissection et pour les sorties sur le terrain ! Tu es un chouette ami et je te souhaite plein de bonheur pour le futur (travail, enfants, mariage, maison avec une barrière blanche et un labrador).

Mon Huuuuuuugues !!! Mon bijoux, mon hibou, mon Hib ! Si une personne m'a beaucoup marqué durant ces trois c'est bien toi ! Ami des galères intergalactiques des week end au labo, des journées 666 sous le signe du démon, des soirs à courir pour prendre le train et attendre une heure finalement car on s'est installé dans le mauvais train, à picoler de la bière après le boulot au Sweeney tod, de la déprime avec nos manips qui marchaient jamais, à m'héberger chez toi, à surveiller mon chat en mon absence...Bref tu es un ami très précieux et j'espère pouvoir te revoir...même si on ne sera plus voisin ! Ben oui il faudra bien que l'on commente la prochaine saison de Game of thrones !!!!!!!

Ma Adeline, Adelin, Deudeu ! Difficile de t'oublier ! Toi, l'ami des animaux, tu m'as apporté Orion un jour de Mars, ce gros patapouf à trois pattes qui m'a été un compagnon fidèle durant cette thèse ! Il m'a été difficile de te voir partir du labo tu sais, ta bonne humeur et ton énergie était une bonne source de motivation ! Tu m'as connue en tant qu'échec girl car à l'époque où ta blouse se promenait en biomol, rien ne marchait !!! Je crois qu'ensuite ton « success post it » m'a été d'une grande aide, car à présent j'en suis à te remercier maintenant que je termine cette thèse. Merci Adeline, merci pour ta grande gentillesse...et on se revoit au Québec non ?

Audrey, ou plutôt Mat pour être plus correcte ...Et oui on respecte toujours la tradition ! Sous tes airs un peu rustres (bon on te pardonne, le froid et la pluie en Belgique implique un dur caractère), une chouette personne se cache ! Apparemment tu reviens en France ... et en

Bretagne en plus...décidément après Seattle...tu aimes vraiment les régions pourries ! Je te souhaite une belle aventure houtrienne la bas !

J'en profite pour souhaiter la bienvenue à Fanny, nouvelle doctorante ici et avec qui j'ai déjà montré la science exacte qu'est le broyage de poisson. Je te souhaite de belles découvertes durant ta thèse !

Je voudrais aussi remercier Pauline et Marlène, Pauline mon ancienne colloc à Bordeaux et devenue une amie et Marlène son a(l)colyte non anonyme et la pro du marathon ! Si nos univers sont complètement différents, j'ai adoré passer du temps avec vous et restez comme vous êtes surtout !

Difficile d'oublier ma Jo (prononcé « Rho »), ma padawan, mon esclave, ma stagiaire quoi ! Si au début j'appréhendais beaucoup ma capacité à t'encadrer, je crois qu'au final je ne me suis pas si mal débrouillée, la preuve, tu es repartie en un seul morceau...mais toujours blonde malheureusement...Merci de m'avoir hébergé chez toi, tu es très doué en animation pour les soirées : panne de gaz, cuisson des pâtes à la station marine, « tu prends trop de place » en pleine nuit...Ca a été un plaisir de te connaître quand même !

Si j'ai remercié toutes les personnes que j'ai connues durant la thèse, je tiens à remercier ceux qui m'ont accompagné (supporté) jusqu'à mon arrivée à Bordeaux.

Mon Clément, mon ami, mon binôme, je n'ai pas beaucoup pris de temps pour te téléphoner, tu sais combien j'aime le téléphone pourtant...mais à chaque fois tu as su par ton humour et ton rire me faire oublier les tracas quotidien de la thèse ! Je te félicite aussi pour ta thèse professionnelle que tu as réussie avec brio ! Tu es un pro de la sécurité maintenant !

Je n'oublie pas les « Morpions » amies de 1^{ère} année de fac à Chambé, j'ai bien fais d'aller me perdre une année en Savoie ! La famille morpion s'est pas mal agrandi depuis ! Merci les filles pour votre amitié précieuse et j'espère qu'on arrivera encore à se voir...un jour par an ?

Je pense aussi à Marianne, Yann et Céline, trois personnes riches en caractère que j'ai eu la joie de connaître en M2 ! Nous venons d'horizons vraiment différents et on est quand même arrivé à se comprendre ! Au fait, j'attends toujours votre danse de la tisane...

Une pensée particulière à ma « vieille copine », Lucile. Merci de m'avoir accueillie dans la famille des champignons il y a quatre années de cela maintenant. J'espère que tu viendras me voir à Québec quand tu seras enfin à la retraite !

Si aujourd'hui j'en suis à écrire les remerciements de ma thèse, c'est grâce à la présence de mes parents, mon frère et ma sœur. Vous me supportez depuis maintenant 27 ans sans jamais faillir, vous avez toujours eu confiance en moi et m'avez toujours encouragé à aller jusqu'au bout, alors merci à vous quatre.... Maman, tu es la personne la plus courageuse que je connaisse, tu as vécu des moments difficiles, tu t'es toujours battu, toujours à garder le sourire et l'humour malgré tes souffrances...je suis très fière de toi et je t'aime fort !

Enfin, je termine ces remerciements avec toi Antoine, mon Antoine, toi qui partage ma vie depuis plus de deux ans maintenant avec Fanny et Aude ! Je pourrais comme à mon habitude t'écrire des milliers de pages pour te dire tout et rien, mais là il ne me vient qu'un mot, Merci...Merci d'être là malgré les 5500 km qui nous séparent, Merci pour ton soutien, Merci pour ton amour...

Je dédie cette thèse à mes parents, Rémy et Hélène

« Réfléchir, c'est déranger ses pensées »

« A force de prévoir l'avenir, on nous le rend aussi fastidieux qu'un passé »

Extrait des pensées d'un biologiste de J. Rostand

Cette thèse déposée à l'école doctorale Science et Environnement (EDSE) de l'Université de Bordeaux résume le travail réalisé depuis Octobre 2011.

Ces trois années de thèse ont été financées par une bourse doctorale issue d'une collaboration entre l'université de Bordeaux et l'université Laval à Québec, couplée à un contrat de moniteur qui m'a permis de faire une activité d'enseignement au cours de ces trois années. Les études ont été financées par l'Agence National de la Recherche (ANR IMMORTEEL) et la région Aquitaine (programme MICANG/Gagilau). Ce travail a donné lieu à la rédaction de quatre articles, à trois communications orales lors des symposiums organisés dans le cadre du projet GAGILAU (Gironde, Garonne, saint LAurent) et à la journée de l'EDSE, ainsi qu'un poster au congrès PRIMO en Mai 2013 au Portugal. J'ai également encadré une étudiante en Master 2^{ème} année « sciences technologie, santé Mention STEE et chimie » au cours de ma dernière année de thèse.

Cette thèse m'aura également permis de découvrir le monde de l'enseignement où si se retrouver de l'autre côté du tableau semblait au départ impressionnant, il en est resté une belle et enrichissante expérience.

Liste des articles présentés dans ce manuscrit :

Article 1: Transcriptome profile analysis reveals specific signatures of pollutants in Atlantic eels (2015). *Ecotoxicology*, 24(1), 71-84.

Article 2: Gene transcription profiling in wild and laboratory-exposed eels reveals common responses to low temperature and chronic pollution exposure. *En préparation*

Article 3: Detecting the exposure to Cd and PCBs by means of a non-invasive transcriptomic approach in laboratory- and wild-contaminated European eels (*Anguilla Anguilla*). *Soumis*

Article 4: Gonadal transcriptome analysis of wild contaminated female European eels during artificial gonad maturation. *Soumis*

<i>Liste des abréviations</i>	1
<i>Introduction générale</i>	3

Chapitre 1 : Contexte de l'étude

1. Implication des technologies « omiques » en écotoxicologie	15
1.1. La toxicogénomique	16
1.2. Les puces à ADN	17
1.3. Application en écotoxicologie aquatique	18
2. L'anguille Américaine et Européenne, un cycle de vie unique	19
2.1. La larve leptocéphale	19
2.2. Le stade civelle	20
2.3. Le stade jaune	20
2.4. Le stade argenté	21
2.5. A. Anguilla et A. rostrata, deux espèces fragiles ?	23
3. Etat des lieux des estuaires du Saint-Laurent et de la Gironde	27
3.1. L'estuaire du Saint-Laurent	27
3.2. L'estuaire de la Gironde	29

Chapitre 2 : Méthodologie

1. Choix des sites d'échantillonnage	33
2. Exposition en laboratoire	36
2.1. Choix des anguilles jaune de Certes	36
2.2. Mise en conditions expérimentales des anguilles	36
2.2.1. Stabulation des anguilles	36
2.2.2. Présentation générale des conditions expérimentales	37
2.2.3. Suivis des paramètres physico-chimiques et de prise de nourriture	38
2.3. Expositions des anguilles jaunes aux contaminants métalliques et organiques	38
2.3.1. Exposition au cadmium – Cd	38
2.3.2. Exposition au méthylmercure – MeHg	39
2.3.3. Exposition aux polychlorobiphényles – PCB	39

2.3.4. Exposition aux pesticides organochlorés – OCP	41
2.3.5. Exposition à la sous-alimentation	41
2.3.6. Exposition à la salinité	42
2.3.7. Exposition à la température	42
2.4 Maturation artificielle d’anguilles femelles au stade argenté	42
2.4.1. Préambule	42
2.4.2 Stratégie d’échantillonnage	44
2.4.3. Mise en conditions expérimentales	44
3. Les méthodes d’analyses	45
3. 1 Stratégie de construction de la puce ADN	45
3.1.1. Le séquençage haut débit	45
3.1.1.1 Principe	45
3.1.1.2. Séquençage du transcriptome des anguilles	46
3.1.2. Elaboration de la puce à ADN	47
3.1.3 Protocole des puces à ADN	50
3.1.3.1. Extraction des ARNm et préparation des ADNc	51
3.1.3.2. Marquage	53
3.1.3.3. Dépôt sur la puce à ADN	55
3.2. Dosages des contaminants des expérimentations en laboratoire	56
3.2.1. Dosage du cadmium	56
3.2.2. Dosage du mercure	57
3.2.3. Dosage des polychlorobiphényles et des pesticides organochlorés	58
3.3. Dosages des contaminants des individus de terrain	58

Chapitre 3 : Impact de la pollution et des facteurs naturels sur le transcriptome de l’anguille Américaine et Européenne en milieu naturel par séquençage haut débit (RNA-Seq)

1. Introduction	61
2. Article: A novel global transcriptome approach of wild Atlantic eels reveals unexpected specific signatures of pollutants	63
3. Conclusion	77

Chapitre 4 : Comparaison des réponses transcriptomiques hépatiques en conditions naturelles et de laboratoire au moyen de la puce ADN

1. Introduction	81
2. Article: <i>Gene transcription profiling in wild and laboratory-exposed eels reveals common responses to low temperature and chronic pollution exposure</i>	82
3. Conclusion	105

Chapitre 5 : Application de la puce à ADN à une méthode non- invasive : comparaison des réponses transcriptomiques in situ et en laboratoire de la nageoire

1. Introduction	109
2. Article: <i>Detecting the effects of Cd and PCBs by means of a non-invasive transcriptomic approach in laboratory- and wild-contaminated European eels (Anguilla Anguilla).</i>	110
3. Conclusion	135

Chapitre 6 : Impact de la pollution sur la maturation des gonades d'anguilles européennes argentées femelles

1. Introduction	139
2. Article: <i>Gonadal transcriptome analysis of wild contaminated female European eels during artificial gonad maturation</i>	140
3. Conclusion	163

Chapitre 7 : Discussion et perspectives

Préambule	167
1. Discussion générale	169
1.1 Approche anguille jaune	169
1.2 Approche anguille argentée	178
1.3 Conclusion	178
2. Perspectives de recherches	180
Références	187
Annexes	203
Annexe I : Informations complémentaires au chapitre 4	203
Annexe II : Informations complémentaires au chapitre 5	216

Annexe III : Participation à l'article Pierron et al., 2014 "Effect of Low-Dose Cadmium Exposure on DNA Methylation in the Endangered European Eel"	234
--	-----

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire (simple brin)
ARN	Acide ribonucléique
Cd	Cadmium
CPE	Carp Pituitary Extract
Cy3	Cyanine 3
Cy5	Cyanine 5
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DNase	Désoxyribonucléase
FAMT	Factor Analysis for Multiple Testing
GSI	Gonadosomatic Index (Indice Gonado-somatique)
HAP	Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
HSI	Hepatosomatic Index (Indice Hépatosomatique)
MeHg	Méthyl-Mercure
OCP	Organic Compound Pesticides
PBDE	Polybromodiphényléthers
PCB	Polychlorobiphényles
RNAse	Ribonucléase
RNAseq	Séquençage haut débit du transcriptome

Introduction générale

Depuis la révolution industrielle à la fin du XIXe siècle, l'homme a considérablement augmenté ses rejets dans l'environnement, générant une pollution très importante qui s'est étendue sur la majorité des écosystèmes terrestres et aquatiques. La contamination de l'environnement due à l'activité humaine a été reconnue par l'ensemble de l'opinion publique au début des années 1960 avec la parution du livre « Silent Spring » écrit par la biologiste Rachel Carson. L'écotoxicologie est née de ce constat et se décrit comme étant la science qui a pour objectif majeur d'évaluer et de prédire l'impact des contaminants sur les organismes, populations, communautés et *in fine* sur les écosystèmes.

Au cours de la deuxième moitié du vingtième siècle, des tests toxicologiques ont été développés dans le but d'évaluer les effets des contaminants sur les organismes et de déterminer notamment les concentrations pour lesquelles aucun dommage n'est observé (Dauer, 1993 ; Vighi et Villa., 2013). Ces tests sont généralement basés sur une relation fondamentale en toxicologie, la relation dose-effet. Cependant, le caractère réductionniste de ces tests soulève bon nombres d'interrogations notamment par leur manque de représentativité et de réalisme écologique (Van straalen, 2003 ; Vighi et al., 2006, Vighi et Villa, 2013). En effet, dans le but d'harmoniser les tests toxicologiques entre les laboratoires et de contrôler plus aisément divers paramètres, ces études sont généralement réalisées dans des conditions expérimentales largement simplifiées par rapport à la complexité des conditions naturelles.

Par exemple, la forme chimique des polluants (e.g. spéciation chimique des métaux), les voies d'exposition (dissous ou trophique), l'effet d'une pollution à long terme (plusieurs mois ou années par exemple), l'effet de cette pollution sur les réseaux trophiques ainsi que les possibles interactions entre différents polluants sont rarement pris en compte. Dans l'environnement, un contaminant se retrouve rarement seul et peut être en interaction avec d'autres contaminants. Un effet antagoniste (annulation ou diminution de l'effet d'une molécule), synergique (augmentation de l'effet) ou simplement additif peut être alors observé. A cela s'ajoute la présence de facteurs naturels comme la présence de pathogènes, la température, la salinité, l'oxygénation de l'eau ou encore les rayons UV qui peuvent modifier la biodisponibilité ou la toxicité du contaminant mais aussi la sensibilité de l'organisme à ce contaminant (Wang, 1987 ; Baines et Fisher, 2008). De plus, si une molécule peut agir directement sur les organismes (effet direct), en inhibant par exemple l'activité d'une enzyme jouant un rôle clé dans la cellule, les polluants peuvent agir indirectement (effet indirect) sur les écosystèmes en entraînant par exemple, la disparition de certains maillons trophiques sensibles à la pollution (Rasmussen *et al.*, 2008).

Plus tard, pour évaluer plus spécifiquement les effets d'une molécule, i.e. ses mécanismes d'actions sur un organisme, de nouveaux outils, appelés biomarqueurs, ont été développés (Clements et Rohr, 2009; Moore *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2008). Un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle, en théorie, l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Depledge et Fossi, 1994). Si ces biomarqueurs permettent de détecter un changement global au sein d'un organisme exposé à un contaminant ou un cocktail de contaminant, ces derniers restent néanmoins limitants dans l'apport de connaissances sur l'effet spécifique d'un contaminant.

La question soulevée aujourd'hui est alors de savoir, parmi l'ensemble des contaminants dans le milieu naturel, quelles sont les substances qui génèrent le plus de toxicité au sein des organismes ? En d'autres termes, comment déterminer les molécules les plus nocives pour l'environnement ? Dans cet objectif, comment alors identifier les effets propres d'une substance en interaction avec d'autres facteurs anthropiques et naturels ? Le but final de l'écotoxicologie étant de prédire les effets d'une substance sur un écosystème, comment extrapoler les effets observés sur un individu à une population ?

Parmi les méthodes utilisées en écotoxicologie, la toxicogénomique est basée sur le principe qu'une molécule peut influencer de manière directe ou indirecte l'expression des gènes (Nuwaysir *et al.*, 1999, Waters *et al.*, 2003, Waters et Fostel, 2004, Waters et Merrick 2009). La toxicogénomique est définie comme l'étude de la réponse d'un génome exposé à des substances toxiques, en quantifiant par exemple le niveau de transcription des ARNm (transcriptomique), le niveau d'expression des protéines dans les tissus et les cellules (protéomique), et les profils métaboliques (ensemble des métabolites produits par un organisme ; métabolomique) (Waters et Fostel, 2004, Waters et Merrick, 2009), en combinaison avec des outils bioinformatiques et de toxicologie. En relation avec l'évaluation des dangers et des risques des produits chimiques, ces méthodes émergentes en écotoxicologie possèderaient l'avantage d'aider à déterminer les mécanismes moléculaires engendrés par l'exposition aux contaminants. L'identification des modes d'action permettrait d'évaluer la toxicité spécifique d'une substance mais également le risque cumulatif de contaminants en utilisant les effets toxiques individuels de chaque substance *in fine* (U.S.EPA 2000, Borgert *et al.* 2004). La toxicogénomique permettrait ainsi d'accroître les connaissances des impacts spécifiques d'un polluant sur les organismes et une meilleure évaluation des risques environnementaux (Snape *et al.*, 2004).

L'objectif général de ces travaux de thèse était de mieux comprendre les mécanismes de toxicité des contaminants présents dans l'environnement, tout en considérant l'environnement aquatique en tant que système complexe, où contaminants et facteurs naturels sont en interaction permanente avec les communautés biologiques.

Pour tenter de déterminer les effets propres des contaminants, nous avons choisi deux écosystèmes aquatiques, caractérisés tant par des variations physico-chimiques (comme la salinité ou la température) que par leur imprégnation historique en contaminants, les hydrosystèmes du Saint-Laurent au Québec et de la Gironde en France. Le travail à la fois en milieu estuarien et fluvial permettait d'avoir une large gamme de conditions biotiques et abiotiques.

En effet, ces hydrosystèmes sont complexes car ils sont constitués de rivières et fleuves en amont (eaux douces) et d'un estuaire en aval. Ce dernier est alimenté en eau saline en aval par la remontée de l'océan et en eaux douces par l'apport des rivières affluentes. Ce continuum rivière-estuaire offre ainsi différentes niches écologiques et est caractérisé par une large gamme de températures, de salinités et de concentrations en oxygène dissous particulières (Beaugrand et al., 2001). A cette mosaïque de milieux, s'ajoute la présence non négligeable de contaminants métalliques et organiques, d'origines anthropiques provenant notamment du fait que les estuaires constituent le réceptacle final de toutes les pollutions générées sur le bassin versant. Ces écosystèmes sont alors caractérisés par une large gamme de polluants et de facteurs naturels (Borja et al., 2000).

Dans l'estuaire du Saint-Laurent, les principaux contaminants sont les polychlorobiphényles (PCBs), des pesticides organochlorés tels que le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), le dieldrine et le mirex provenant des activités humaines pratiquées au niveau des rivières affluentes (Couillard et al. 1997 ; Gagnon, 1998). La présence des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), des dioxines, des furannes et du mercure (Gagnon, 1998) avait également été décrite tant dans les sédiments que dans les organismes aquatiques.

L'estuaire de la Gironde est quant à lui historiquement contaminé en cadmium (Cd), un métal non-essentiel (sans propriété biologique essentielle à l'organisme) qui provient de l'ancienne activité industrielle minière, située 450 km en amont de l'estuaire, à proximité de Decazeville (Aveyron) (Shäfer et al., 2002). Plus récemment, la présence de polluants organiques tels que les PCBs et les polybromodiphényléthers (PBDE) a été rapportée (Tapie, 2006).

Le choix du modèle biologique pour cette thèse s'est porté sur l'anguille Européenne (*Anguilla anguilla*, Linnaeus 1758) et Américaine (*Anguilla rostrata*, Lesueur 1821). Ces deux espèces ont un cycle de vie particulier et semblable, caractérisées par deux migrations océaniques et deux métamorphoses. Les anguilles naissent en mer des Sargasses sous forme de larves leptocéphales puis se métamorphosent en civelles durant leur migration vers les côtes Atlantiques. Une fois au niveau du plateau continental, la civelle se pigmente pour devenir une anguille jaune et se sédentarise. Le stade « jaune » correspond à la phase de croissance somatique des anguilles. Cette phase somatique peut durer entre 3 et 20 ans selon les individus (Tesch, 2003). L'anguille jaune va ensuite subir une métamorphose pour se transformer en anguille argentée. Ces dernières, devenues sexuellement matures, dévalent alors les cours d'eaux pour rejoindre l'océan Atlantique et entamer leur migration atlantique pour rejoindre leur lieu de reproduction commun en mer des Sargasses.

Par sa position au sommet de la chaîne alimentaire, l'anguille intègre non seulement les effets directs des contaminants (contamination *via* l'eau et la nourriture) mais également les effets indirects engendrés à des niveaux trophiques inférieurs (Rasmussen *et al.*, 2008). En outre, par sa longue phase de croissance, son régime alimentaire varié et son mode de vie benthique, l'anguille est une espèce particulièrement exposée aux polluants, propice à une bioaccumulation importante et qui, en conséquence, intègre parfaitement les niveaux de contamination locaux en polluants à la fois métalliques (Durrieu *et al.*, 2005) et organiques comme les PCBs (Tapie *et al.*, 2011) ou les pesticides organochlorés (Couillard *et al.*, 1997 ; Hoff *et al.*, 2005). Le caractère panmictique¹ enfin de ces deux espèces empêcherait l'apparition de sous-populations locales génétiquement différentes entre elles. Par conséquent le transcriptome ne serait pas ou peu influencé par les divergences génétiques entre ces sous-populations. L'absence de divergence génétique permettrait alors de comprendre les mécanismes liés à la contamination à l'échelle d'une génération. Depuis les trente dernières années, un déclin massif de leurs populations a été observé. La population d'anguilles Européennes est actuellement considérée en danger majeur d'extinction (ICES 2001, 2007, Dekker 2003a, 2003b, IUCN 2013) et les anguilles Américaines du fleuve Saint-Laurent sont quant à elles menacées d'extinction (COSEPAC, 2012). La pollution des écosystèmes aquatiques est parmi l'une des nombreuses causes supposées pour expliquer leur disparition (Feunteun, 2002, Belpaire *et al.* 2009, Geeraerts et Belpaire 2010).

¹ Une population où tous les individus se reproduisent au hasard.

Nous avons vu que les hydrosystèmes du Saint-Laurent et de la Gironde sont caractérisés par la présence historique de contaminants liée aux activités humaines. Cependant, les données de contaminations, des anguilles vivants dans ces deux hydrosystèmes, mais aussi d'impacts sur la santé de ces dernières sont relativement anciennes. Il était alors nécessaire de caractériser dans un premier temps les différents facteurs naturels et anthropiques retrouvés actuellement le long de ces systèmes. Un échantillonnage d'anguilles au stade jaune (*A. rostrata* pour le Saint-Laurent et *A. anguilla* pour la Gironde) a ainsi été réalisé au niveau de quatre sites situés dans l'estuaire et leurs affluents pour chaque hydrosystème.

Pour tenter de caractériser les mécanismes d'action des contaminants sur un organisme et de démêler leurs effets propres sur ces animaux en milieu naturel, la stratégie du séquençage haut débit du transcriptome du foie d'anguilles échantillonnées sur le terrain a été adoptée. Cette stratégie a permis d'établir le transcriptome (niveau de transcription de l'ensemble des gènes d'un individu) pour chaque individu des deux espèces. Des analyses de corrélation ont été effectuées entre l'ensemble des gènes séquencés et le niveau de contamination des organismes dans le but d'associer un ensemble de gènes à un contaminant ou un facteur naturel particulier. La réalisation et l'étude du transcriptome étant une approche relativement nouvelle en écotoxicologie, il était primordial de valider les liens établis entre des gènes et un facteur. En effet, l'association entre un gène et un facteur ne reposait que sur des analyses de corrélations. De plus, ces analyses ayant été réalisées à partir de données provenant du terrain, i.e., de sites naturels, tous les facteurs pouvant agir sur le transcriptome n'ont alors pas été pris en compte. Certaines corrélations obtenues pourraient par conséquent être erronées. En d'autres termes, les gènes pouvaient être influencés par d'autres facteurs non mesurés. Il était alors primordial d'approfondir et valider cette approche. Des expositions en laboratoire à des contaminants de façon séparée ont alors été réalisées. L'établissement des profils transcriptomiques pour chaque contaminant demandant un nombre trop important d'analyses pour être réalisées par séquençage, nous avons développé une puce à ADN. Cet outil transcriptomique déjà bien utilisé dans cette discipline (Lettieri, 2006 ; Denslow et al., 2007, Poynton et al., 2007, 2008a, 2008b) confère un plus faible coût et sa rapidité de mise en œuvre permet de réaliser un plus grand nombre d'études transcriptomiques. La puce à ADN, développée dans cette thèse, a été construite à partir de 1000 gènes candidats qui ont été identifiés comme étant associés aux différents facteurs mesurés sur le terrain.

L'application de cette puce sur des anguilles exposées en laboratoire à différents contaminants de façon séparée et sur des anguilles prélevées sur le terrain a permis ensuite de

comparer l'ensemble des réponses transcriptomiques obtenues. Cette comparaison a permis de valider ou invalider les liens établis entre un ensemble de gènes et un facteur à partir des données de terrain. Dans un second temps, cette analyse comparative avait pour objectif de hiérarchiser les effets des contaminants sur les anguilles sauvages. Cette hiérarchisation avait pour but de déterminer quel contaminant engendre le plus d'effets toxiques chez les animaux.

Si la puce a d'abord été développée à partir du foie des anguilles, dans une perspective de tester une méthode non-invasive, nous avons choisi d'utiliser la puce à ADN sur des échantillons de nageoire caudale dans le but d'éprouver la capacité de ces dernières à « répondre » à la contamination. Pour cela des individus exposés en laboratoire et issus du terrain ont été utilisés et les profils de transcription des gènes obtenus à partir de la nageoire de chaque individu et de la puce à ADN ont été comparés de la même façon et dans le même but que l'étude menée sur le foie.

Au cours de ces travaux, nous avons tenté de i) comprendre les mécanismes d'actions propres à chaque contaminant et ii) hiérarchiser les effets des contaminants en milieux naturels. Cependant, l'ultime but de l'écotoxicologie est d'appréhender l'impact des contaminants sur les populations naturelles. La disparition massive des anguilles Européennes depuis plusieurs décennies nous a alors conduits à évaluer l'implication potentielle de la contamination dans le déclin de cette espèce. Dans l'objectif d'investiguer la contribution de la pollution au déclin des anguilles, le stade argenté de l'anguille a été choisi car il représentait les futurs géniteurs. Pour cela, des anguilles argentées provenant de l'estuaire de la Gironde considéré comme « contaminé » et d'autres provenant de Certes, considéré comme un site « propre », ont été maturées artificiellement en laboratoire. Les profils d'expression des gènes obtenus *via* la puce à ADN à partir des gonades maturées ont été établis. La comparaison de l'expression des gènes entre les individus issus des deux sites a été réalisée dans le but de comprendre dans quelle mesure la contamination affecterait les capacités de reproduction des géniteurs. Le possible impact sur les gonades des futurs géniteurs pourrait être extrapolé au niveau de la population. Cette extrapolation permettrait de comprendre dans quelle mesure la contamination jouerait un rôle dans le déclin de ces deux espèces.

La démarche générale des travaux réalisés dans cette thèse est illustrée en figure 2.

La présentation de cette thèse se décline en sept chapitres, le premier chapitre sera alloué à la description du contexte général dans lequel ce travail s'inscrit dont une présentation plus explicite du cycle de vie des anguilles et la présentation des deux écosystèmes.

Le chapitre 2 présentera l'ensemble des méthodes utilisées dans cette thèse.

Le chapitre 3 sera dédié à l'étude du transcriptome du foie des anguilles jaunes (stade somatique) prélevées dans les deux systèmes par séquençage haut débit. Au cours de ce chapitre nous tenterons de répondre à la question : *Comment détecter et de démêler les effets propres de chaque contaminant chez des individus sauvages ?*

Si dans le chapitre 3, l'étude s'est basée sur des données du séquençage d'animaux de terrain, le chapitre 4 sera quant à lui dévolu à l'étude des profils transcriptomiques établis avec la puce à ADN à partir du foie d'anguilles exposées en laboratoire à des contaminants de façon individuelle. Ces profils obtenus en condition de laboratoire seront ensuite comparés à ceux établis à partir du foie d'anguilles au stade jaune prélevées *in situ*. La comparaison de l'ensemble de ces profils aura d'abord pour but de valider et de renforcer les liens entre un groupe de gènes et un facteur. Le second objectif de ce chapitre tentera de répondre à cette seconde question :

Ces groupes de gènes peuvent-ils être utilisés pour démêler et hiérarchiser les effets des contaminants chez des individus prélevés in situ ?

Le chapitre 5 décrira l'étude menée sur la nageoire caudale sur des anguilles exposées en laboratoire et prélevées sur le terrain pour tester la troisième hypothèse de travail : *Peut-on détecter les effets des contaminants au moyen d'une méthode non-invasive ?*

Le chapitre 6 sera consacré à l'étude menée sur les anguilles argentées femelles (stade mature) et où nous tenterons de répondre à cette dernière question : *La pollution anthropique peut-elle compromettre la capacité de reproduction des anguilles ?*

Enfin une synthèse de l'ensemble des résultats sera proposée au chapitre 7 soulevant de nouvelles perspectives de travail de recherche.

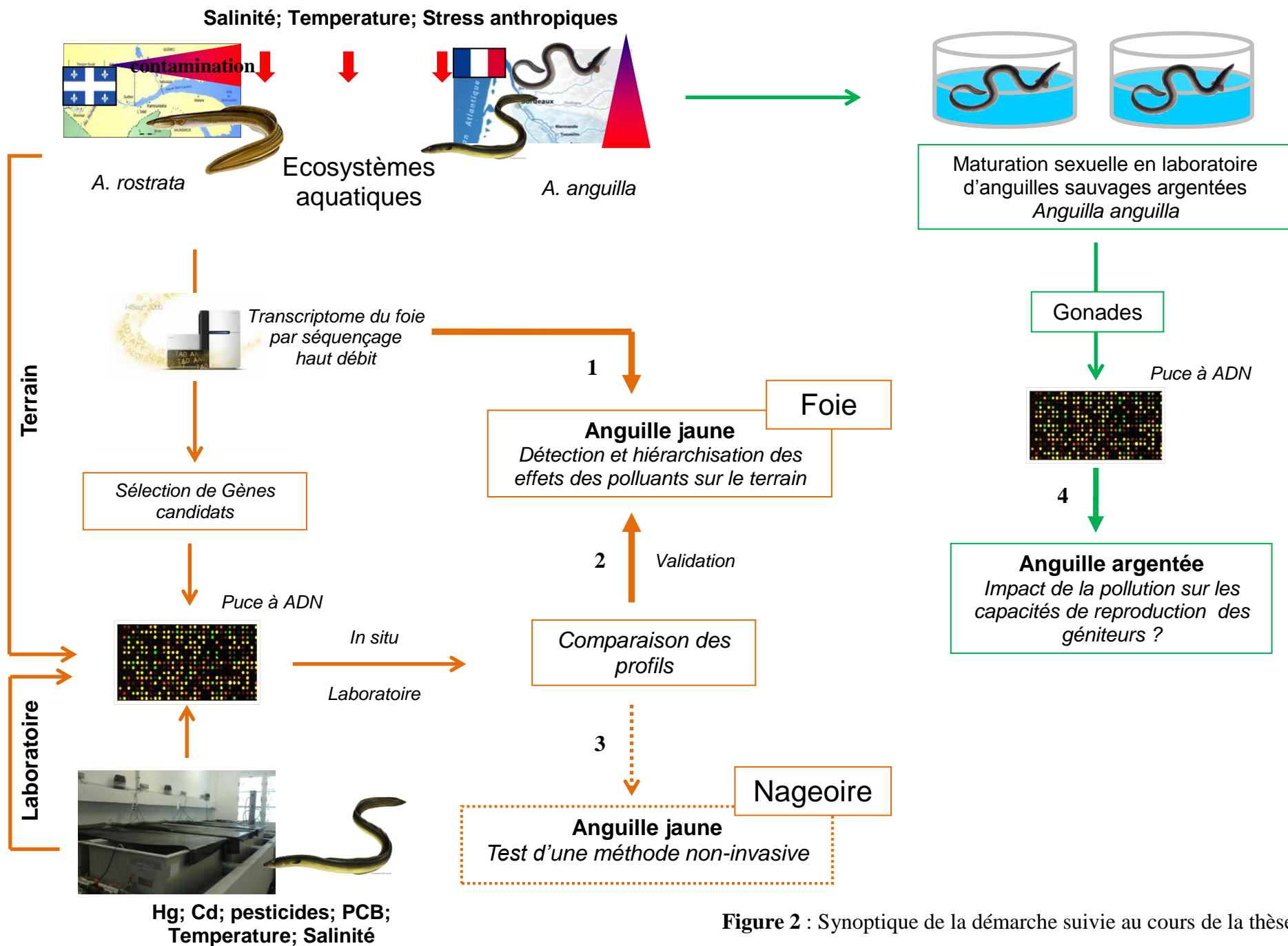


Figure 2 : Synoptique de la démarche suivie au cours de la thèse.

Chapitre 1

Contexte de l'étude

1. Implication des technologies « omiques » en écotoxicologie

La prise de conscience de la contamination des écosystèmes au début des années 1960 a amené la question des effets de ces contaminants sur la santé des organismes vivants dont l'homme, pourtant à l'origine de cette pollution. L'écotoxicologie, basée sur les concepts de la toxicologie et mêlant également l'écologie et la chimie se définit comme la science ayant pour objectif d'évaluer et de prédire l'impact des contaminants sur les organismes, populations, communautés et *in fine*, sur les écosystèmes.

Outre l'échantillonnage de sédiment et d'eau pour mesurer les quantités de contaminants présents dans les milieux aquatiques, l'utilisation d'organismes aquatiques et la mesure de leurs réponses biologiques en tant qu'outils de diagnostic de contamination et de gestion du risque toxique ont ensuite été mis en avant pour la surveillance de la qualité des écosystèmes aquatiques (Allan et al., 2006 ; Galloway et al., 2006 ; Hagger et al., 2008). En effet, la mesure de la réponse au niveau cellulaire et moléculaire des organismes face à des stimuli extérieurs apparaissent comme des indicateurs sensibles et précoces pour mesurer une dégradation potentielle d'un écosystème (Galloway et al., 2004).

Cependant les approches et les modèles classiquement utilisées en écotoxicologie, sont jugés aujourd'hui insuffisants pour établir un effet d'un contaminant sur un écosystème et sur ses populations (Miracle et Ankley, 2005). De plus, les organismes sont en interaction dynamique avec leur environnement et le risque d'une vision restreinte de ces organismes dans leur niche écologique pourrait amener à de mauvaises interprétations des réponses chez l'organisme étudié (Luhmann, 2004 ; Steinberg et Ade, 2005). Les questions aujourd'hui soulevées sont alors : Comment réduire les incertitudes dans la compréhension des impacts des contaminants sur l'environnement ? Comment définir le stress par rapport à un système dynamique ? Comment évaluer l'impact d'un contaminant sur un organisme dans un environnement multi-contaminé ? Quel est le mode d'action spécifique d'un contaminant en milieu naturel ? Comment déterminer quelle substance engendre le plus d'effet nocif sur les communautés naturelles ?

Pour répondre à ces questions complexes, l'utilisation des technologies dites « omique » a été mise en avant par Miracle et Ankley en 2005 puis plus tard lors d'un consortium sur l'évaluation des risques en écotoxicologie aquatique tenu en 2008 à Vancouver (van Aggelen et al., 2010). Ces technologies offriraient une image dynamique des systèmes biologiques. Les « omiques » englobent de nombreuses technologies comme la génomique, la protéomique, la métabolomique ou encore la transcriptomique.

Pour exemple, au cours des années 2000, l'avènement de la génomique a permis d'améliorer les connaissances du génome d'espèces aquatiques modèles comme la daphnie (*Daphnia magna* ; Watanabe et al., 2005), le medaka (*Oryzias latipes* ; Matsuda et al., 2001) ou encore le poisson zèbre (*Danio rerio* ; Broughton et al., 2001). De la génomique a ensuite découlé la transcriptomique qui consiste à établir les niveaux de transcription de l'ensemble des gènes d'un individu donné à partir du séquençage et de la quantification des molécules d'ARNm.

Tous les organismes vivants, des plus simples aux plus complexes, sont composés d'une à plusieurs millions de cellules. Ces dernières présentent des caractéristiques communes en termes de structure mais également de fonctionnement. Trois types de macromolécules fondamentales sont impliqués, l'ADN, les ARN et les protéines. Un gène est une portion d'ADN dont la séquence code l'information nécessaire à la synthèse d'une protéine et l'ADN est localisé dans le noyau de la cellule chez les eucaryotes. Au sein de ce compartiment, un brin d'ADN est lu et copié en un transcrit que l'on appelle ARN messager (ARNm), capable de sortir du noyau pour aller dans le cytoplasme. Ce processus est appelé transcription. Il existe également les ARN ribosomiques (majoritaires) qui forment avec des protéines les ribosomes qui traduiront les ARNm en protéines, et les ARN de transfert (ARNt) dont le rôle est d'amener les acides aminés jusqu'aux ribosomes. Les cellules sont constamment soumises à de nombreux signaux extracellulaires (hormones, parasites, stress physiques ou chimiques) et induisent des voies de signalisation pour assurer de nombreuses fonctions comme la croissance et le cycle cellulaire, le métabolisme énergétique ou encore la réponse au stress (Pearce et Humphrey, 2001 ; Brauer et al., 2008). Cela permet dans un second temps une adaptation des cellules aux conditions extérieures via par exemple une réponse transcriptionnelle (Wenger, 2002). En d'autres termes, l'augmentation ou la diminution du processus de transcription des gènes permet à l'organisme de s'adapter et de lutter contre la toxicité des polluants. A l'inverse, un polluant, en perturbant certaines voies de signalisation, peut aboutir à la dérégulation du niveau de la transcription de certains gènes. La mesure de ces changements de transcription pourrait permettre de détecter si l'organisme est soumis ou non à un stress et d'identifier les mécanismes d'action de ce stress.

1.1. La toxicogénomique

L'approche de la génomique appliquée à la toxicologie, nommée toxicogénomique (Aardemaa et MacGregor 2002) a permis de mieux évaluer en laboratoire les effets des molécules toxiques présentes dans l'environnement (Snape et al., 2004). L'expression des

génomiques induite par une substance toxique peut être utilisée pour identifier les impacts de cette substance sur l'organisme. Elle permettrait de mesurer les réponses cellulaires à différentes doses de polluants, d'évaluer ses mécanismes d'action, et d'estimer enfin la variabilité interindividuelle de la sensibilité aux substances toxiques.

Dans la même optique, le recours à la transcriptomique en écotoxicologie est basé sur le fait que la majorité des contaminants induisent des changements sur le niveau de transcription d'un certain nombre de gènes. Cet ensemble de gènes, spécifique d'un facteur, constitue une « signature » biologique du contaminant et reflète le mécanisme ou le mode d'action de ce dernier sur l'organisme (Merrick et al., 2004 ; Miracle et Ankley, 2005). L'utilisation de la méthode SAGE (Serial Analysis of Gene Expression ; Velculescu et al., 1995) permettant une analyse de l'expression des gènes sans la connaissance au préalable des séquences géniques avait permis en laboratoire d'associer certains gènes à un contaminant particulier chez la crevette *Palaemonetes pugio* (Griffitt et al., 2007). Cette étude avait permis en effet de distinguer un ensemble de gènes dont le niveau d'expression était affecté par une exposition au cadmium qui était distinct de deux autres patterns plus similaires et reliés à deux pesticides, le fipronil et l'endosulfan. Cette approche transcriptomique à travers ces « signatures » de gènes avait permis la distinction des différents modes d'action des contaminants. De tels gènes constituent de potentiels biomarqueurs rapides et probants (Griffitt et al., 2007).

1.2. Les puces à ADN

Ces « signatures » des contaminants ont été également appréhendées à l'aide de la technologie des puces à ADN (Neumann et Galvez, 2002). Une puce à ADN est une surface de verre inerte sur laquelle sont déposés jusqu'à plusieurs milliers de séquences d'ADN qui sont complémentaires de la séquence des ADNc (simple brin) de gènes d'intérêt et qui permet la lecture simultanée du niveau de transcription de plusieurs milliers de gènes. Une étude menée sur la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* exposée à différents contaminants en laboratoire avait permis, via une puce à ADN, de déterminer le mode d'action spécifique de chaque contaminant étudié. En effet, un lien avait été établi entre un profil de gènes et le mode d'action d'un contaminant particulier, constituant des biomarqueurs potentiels de ce polluant (Hook et al., 2006). Poynton et al. à la fin des années 2000 (Poynton et al., 2007, 2008a, 2008b) ont également développé une puce à ADN sur la daphnie exposée à des métaux. Ces travaux ont ainsi permis d'associer un métal comme le cuivre ou le cadmium à une signature transcriptomique spécifique. En outre, des études ont montré que les niveaux de transcription

d'un gène étaient souvent fonction de la concentration de la molécule étudiée (Owen et al., 2008). Le changement du niveau de transcription d'un gène est considéré comme une réponse adaptative possible de l'organisme exposé (Gentry et al., 2010). L'établissement d'un profil transcriptomique en tant que « signature » d'un contaminant au travers de la réponse d'un individu a pour but de mieux connaître les voies métaboliques affectées et mieux évaluer ainsi la toxicité d'un polluant sur l'organisme.

Cependant, les puces ADN se limitent à un nombre parfois restreint de gènes du fait du peu de connaissance des séquences du génome des espèces. Plus récemment l'avènement d'outils d'analyses à haut débit du génome et du transcriptome a permis une exploration de l'ensemble des ARNm d'un individu (Schirmer et al., 2010) et d'élargir ainsi l'exploration des effets d'une molécule sur un individu. Ces outils à large spectre, en ne ciblant pas une fonction ou un gène en particulier permettent ainsi une approche sans *a priori* pour étudier l'impact d'une substance sur un organisme (Qian et al. 2014).

1.3. Application en écotoxicologie aquatique

Ces outils à haut débit ont donné une perspective nouvelle pour des espèces modèles et non modèles dont le génome reste peu ou pas séquencé d'une part et dans l'évaluation des effets des contaminants dans les milieux naturels d'autre part (Van Aggelen et al., 2008). Les systèmes aquatiques sont en effet des systèmes complexes où les contaminants issus des activités anthropiques sont en mélange et où il demeure difficile d'évaluer leurs effets propres sur les individus (Falciani et al., 2008). L'utilisation de ces technologies à haut débit appliquée à des espèces « clés » de leur environnement offre une perspective nouvelle dans la compréhension des effets des contaminants sur les écosystèmes (Schirmer et al., 2010, Ekblom et Galindo, 2011). Dans une démarche d'évaluation écotoxicologique des milieux naturels, il est en effet nécessaire d'utiliser des espèces considérées comme « sentinelles » d'un environnement donné. L'anguille Européenne et Américaine sont deux espèces colonisant des milieux très diversifiés par leurs capacités exceptionnelles d'adaptation et qui sont situées au sommet de la pyramide des biomasses et qui sont donc susceptibles d'accumuler les contaminants transférés le long du réseau trophique. En effet, l'anguille par sa longue phase de croissance, son régime alimentaire varié et son mode de vie benthique, est une espèce particulièrement exposée aux polluants, et sujette à une bioaccumulation importante. Ces deux espèces intègrent alors le niveau de contamination de leur écosystème tant en polluants métalliques (Durrieu et al., 2005) et organiques comme les

PCBs (Bordajandi et al., 2003, Tapie et al., 2011), les HAPs (Roche et al., 2002) ou encore les pesticides (Hoff et al., 2005). De plus, par sa position au sommet de la chaîne alimentaire, l'anguille intègre non seulement les effets directs (contamination via l'eau et la nourriture) mais également les effets indirects engendrés à des niveaux inférieurs, tels qu'une modification des chaînes alimentaires (Rasmussen et al., 2008).

2. L'anguille Américaine et Européenne, un cycle de vie unique

L'anguille Américaine (*Anguilla rostrata*, LeSueur 1821) et l'anguille Européenne (*Anguilla anguilla*, Linnaeus 1758) occupent de larges aires de répartition géographique. L'anguille d'Amérique se distribue le long des côtes Est de l'Amérique du Nord et s'étend jusqu'au Groenland au nord et jusqu'au Vénézuéla au sud (Scott et al., 1974 ; Boetius, 1985 ; Tesch, 2003). Au Canada, *A. rostrata* se retrouve dans les eaux douces qui lui sont accessibles incluant les rivières, les marais et les lacs, mais aussi les estuaires et les eaux côtières de l'océan Atlantique. L'anguille d'Europe quant à elle se retrouve le long de la côte Ouest du continent européen, tout autour de la mer Méditerranée et s'étend jusqu'en Islande et au Nord-Ouest de l'Afrique (Bertin 1951 ; Avise, 2003). Les anguilles d'Atlantique (européenne et américaine) sont des poissons catadromes avec un cycle de vie très particulier et relativement identique (Figure 1.2). En effet, ces deux espèces se caractérisent par deux phases de migration transatlantique, deux métamorphoses et par une reproduction unique au cours de leur vie en Mer des Sargasses.

2.1. La larve leptocéphale

La capture de larves leptocéphales par Schmidt en 1922 en mer des Sargasses, localisée entre les Bermudes et les Bahamas, a permis de désigner ce lieu comme le site supposé de reproduction des anguilles atlantiques. A l'heure actuelle, aucun individu adulte (stade argenté) ou œuf n'ont été recueillis en mer des Sargasses, leur zone de reproduction et de naissance exacte restant aujourd'hui encore un mystère pour les scientifiques (Bertin, 1951; van ginneken et Maes, 2005). Concernant la migration des larves leptocéphales vers les côtes respectives de chaque espèce, l'hypothèse la plus soutenue serait que ces dernières se déplaceraient de manière passive par le biais des courants marins du Gulf Stream et de la dérive Nord Atlantique. Cependant, il ne serait pas impossible que les larves soient capables d'effectuer une nage active les amenant à faire des migrations verticale dans la colonne d'eau (Castonguay et Mc Cleave, 1987, van ginneken et Maes, 2005). Le temps nécessaire pour

achever leur migration vers les côtes seraient de 7 à 12 mois pour *A. rostrata* et de 21 mois pour *A. anguilla* (Wang et al., 2000 ; Bonhommeau et al., 2009 ; Bonhommeau et al., 2010). Une fois à proximité des côtes, les larves leptocéphales subissent une première métamorphose, elles deviennent des civelles transparentes (Tesch 2003).

2.2. Le stade civelle

L'individu prend une forme beaucoup plus proche du stade adulte. Des changements importants ont lieu au cours de cette étape : la civelle est plus petite que la larve leptocéphale, les dents larvaires disparaissent, l'œsophage, le tractus digestif et l'intestin de la civelle sont moins différenciés qu'au stade précédent et la civelle pèse entre 0,2 et 0,3 g (Tesch, 2003). A cette période elle ne se nourrit plus, et ce n'est que plus tard qu'elle recommencera cette activité. A l'abord du plateau continental, la civelle atteint les eaux douces situées en amont des estuaires. Sa principale période de migration en estuaire a lieu en hiver et deux types de migrations peuvent être distingués (Tesch, 2003). Dans les estuaires, soumis à la marée, les civelles utilisent les courants tidaux ascendants pour migrer et si le courant s'inverse (période de jusant), ces dernières peuvent s'enfouir dans le sédiment en attendant la prochaine marée ascendante. En eau douce, les civelles ne sont plus soumises aux marées et adoptent alors une nage active à contre-courant et remontent ainsi les cours d'eau. Cette migration se caractérise par une pigmentation noire qui s'intensifie au niveau dorsal et dans un deuxième temps une coloration jaune qui apparaît au niveau ventral (Durif et al., 2003). Ces dernières deviennent des anguillettes puis anguilles jaunes.

2.3. Le stade jaune

Cette phase n'intervient qu'une fois la migration terminée. Les civelles devenues anguillettes vont se sédentariser et adopter un mode de vie benthique, nocturne et solitaire. Cependant, des études ont montré que certaines espèces du genre *Anguilla*, dont *A. rostrata* et *A. anguilla* montraient une catadromie facultative. En effet, l'analyse chimique du ratio strontium : calcium (Sr:Ca) dans les otolithes d'individus prélevés dans différents estuaires d'Europe et d'Amérique du Nord (Canada et Etats Unis) a mis en évidence différentes histoire de vie : résidence unique (eau douce, saumâtre ou marine), soit multiple avec notamment un déplacement d'un habitat dulcicole vers un habitat saumâtre et inversement lors des premières années de vie (Jessop et al., 2002 ; Arai et al., 2006 ; Daverat et al., 2006). Pour exemple,

100% des individus échantillonnés dans la rivière de la Garonne (France) étaient sédentaire, contre 23% échantillonnés dans la rivière Saint-Jean (Canada) (Daverat et al. 2006).

Durant cette phase de croissance, de manière générale, les individus de grande taille vont privilégier les zones profondes, en comparaison des petits individus, qui vont eux se loger dans des zones au contraire peu profondes (Tesch, 2003). Ce stade dure entre 3 et 20 ans pour l'anguille Européenne et jusqu'à 30 ans pour l'anguille Américaine, et est majoritairement consacré à la recherche de nourriture. En effet, il correspond à la phase de croissance somatique de l'anguille au cours de laquelle le stockage de réserves lipidiques est considérable, afin de préparer les individus à leur migration de reproduction (Tesch 2003). Durant cette phase, les anguilles peuvent passer jusqu'à 74% de leur temps au fond des cours d'eau, i.e., à proximité du sédiment (Tesch 2003 ; Tomie et al., 2013). Leur régime alimentaire est essentiellement constitué de petits crustacés, de mollusques bivalves et de petits poissons pour les individus d'eaux saumâtres, et de larves d'insectes et de petits poissons pour celles d'eaux douces (Tesch 2003). Lors de cette étape de développement, les anguilles restent immatures et difficilement identifiables sexuellement.

2.4. Le stade argenté

Au terme de leur croissance, les anguilles réalisent une dernière métamorphose appelée « argenture ». Ce processus de métamorphose se caractérise par plusieurs changements externes de l'individu : l'anguille se revêt d'une couleur sombre (presque noire) en face dorsale, blanche et argentée en face ventrale, la peau s'épaissit, la sécrétion de mucus augmente, le diamètre des yeux s'accroît de manière importante (en parallèle avec le développement des cellules en bâtonnet) et les nageoires pectorales s'allongent (Tesch, 2003). A la fin de l'argenture, l'anguille cesse de se nourrir, le tractus digestif régresse progressivement (Durif, 2003) et l'anus se ferme. Les anguilles dévalent les cours d'eaux pour entamer leur seconde migration transatlantique en groupe sur une période très courte et ce phénomène serait dû à des facteurs environnementaux. Le cycle lunaire et la pluviométrie pourraient faire partie des facteurs déclenchant leur migration aval (Tesch, 2003). La maturation de leur appareil reproducteur se réalise lorsque ces dernières quittent les côtes et migrent en direction de leur lieu supposé de reproduction (la Mer des Sargasses). A l'heure actuelle, la forte pression due à la nage en profondeur (Sébert et al., 2007) et l'exercice natatoire (van Ginneken et Maes, 2005) pourraient être des paramètres pouvant induire la maturation.



Figure 1.1 : Cycle biologique commun de l'anguille Européenne (*Anguilla anguilla*) et Américaine (*Anguilla rostrata*) et aire de leur répartition géographique respective (flèche rouge = *A. rostrata* ; flèche jaune = *A. anguilla*).

L'individu utilise alors ses réserves lipidiques accumulées durant sa phase de croissance somatique afin d'assurer sa longue migration vers les Sargasses, où l'anguille d'Amérique doit parcourir 2000 km (5000 km pour les plus éloignées) et 5000 km pour l'anguille Européenne (8000 km pour les plus éloignées). Les appareils reproducteurs (gonades) vont également se développer progressivement durant la migration jusqu'au moment de la reproduction (Vidal et al., 2004) en utilisant également les réserves énergétiques. Si les deux espèces Américaines et Européennes ont leur lieu de reproduction commun en Mer des Sargasses, il a néanmoins été proposé que les deux espèces utilisent des lieux de reproduction distincts. Une autre hypothèse serait que ces dernières ne se reproduiraient pas durant la même période dans l'année évitant ainsi les rencontres entre les espèces (Wirth et al., 2003, Van Ginneken et Maes, 2005). L'anguille Américaine se reproduirait entre Février et Avril et l'anguille Européenne entre Mars et Juin (McCleave et Kleckner, 1987 ; Van Ginneken et Maes, 2005 ; Bernatchez et al., 2011). Il existe toutefois des hybrides entre les deux espèces malgré leurs aires et leurs périodes de reproduction distinctes (Albert et al., 2006). Pour ces deux espèces leur reproduction se fait de manière aléatoire entre les individus, elles sont alors panmictiques (Dannowitz et al., 2005 ; Gagnaire et al., 2012 ; Pujolar et al., 2014). Enfin, une fois que les anguilles se sont reproduites, ces dernières mourraient d'épuisement.

2.5. Les anguilles d'Atlantique, deux espèces fragiles ?

Depuis le début des années 1980, ces deux espèces ont vu leurs populations s'effondrer, avec une chute de 40 à 80% des stocks de pêches au Canada (Fig. 1.2) (Haro et al., 2000) et un recrutement de nouveaux individus qui a subi une baisse de près de 98% dans le fleuve Saint-Laurent et dans le lac Ontario (Tomie et al., 2013). Quant aux anguilles d'Europe, ces dernières ont vu leur taux de recrutement en civelle diminuer de 90 à 99% (Fig. 1.3) (Dekker, 2003a, Stone 2003, Westin 2003, Pierron, 2007a). L'anguille *A. rostrata* est aujourd'hui considérée au Canada comme menacée depuis 2012 (COSEPAC 2012), quant à l'espèce d'Europe, *A. anguilla*, cette dernière est inscrite sur la liste rouge des espèces en danger critique d'extinction de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (IUCN, 2014). La disparition massive des populations d'anguilles d'Atlantique serait fortement liée au cycle de vie particulier de ces deux espèces. Selon de nombreux auteurs, la baisse des stocks des populations d'anguilles d'Atlantique pourrait être liée à différents facteurs tels que la surpêche, la prédation des larves leptocéphales, ou encore les pertes d'habitats (ICES, 2009). Les changements climatiques et océaniques également provoqueraient une dérive et un ralentissement du courant emprunté par les larves leptocéphales lors de leur migration et

diminueraient leur capacité à atteindre les côtes (Castonguay et al., 1994 ; Knights, 2003 ; Friedland et al., 2007). Les obstacles à la migration continentale en seraient également la cause, avec la construction de barrages hydroélectriques notamment, empêchant l'avalaison des civelles et anguillettes dans les rivières et la dévalaison des anguilles argentées pour se rendre aux Sargasses (McCleave, 2001; Feunteun et al., 1998). Pour exemple, au Canada, 40% des anguilles argentées passant du Lac Ontario vers le fleuve Saint-Laurent seraient tuées par les turbines des barrages hydroélectriques. La production aquacole d'anguilles japonaises (*Anguilla japonica*) en Europe a entraîné l'apparition et la prolifération de parasites comme le nématode *Anguillicola crassus* qui est détecté chez les anguilles d'Europe depuis les années 1980 (Palstra et al., 2007).

Plus récemment, la dégradation de la qualité des eaux a été avancée comme l'une des causes possible, pour expliquer le déclin de ces populations (Larsson et al., 1990, Feunteun, 2002). En effet le cycle de vie des anguilles, notamment leur longue phase de croissance, leur régime alimentaire varié et carnivore, leur place au sommet de la chaîne alimentaire ainsi que leur mode de vie benthique les exposeraient de façon très importante aux contaminants présents dans les écosystèmes aquatiques. Plusieurs contaminants pourraient ainsi s'accumuler dans les tissus des anguilles comme les branchies, le foie, les reins, les muscles ou encore les gonades et causer des effets délétères de façon individuelle ou synergique (Geeraert et al., 2010).

La contamination des eaux de surface et des sédiments en métaux comme le cadmium (Cd), le mercure (Hg), le plomb (Pb), le cuivre (Cu) ou le nickel (Ni), et les composés organiques comme les pesticides, les HAPs et les PCBs pourraient contribuer en effet au déclin de ces deux espèces (Hodson et al., 1994 ; Couillard et al., 1997 ; van Ginneken et Maes, 2005 ; Pierron et al., 2007a, Belpaire et Goemans, 2007, Maes et al, 2008 ; Pierron et al, 2009; Geeraerts et al., 2010, Belpaire et al., 2011, Van Ael et al., 2014). Ces contaminants ont une présence ubiquiste dans les écosystèmes aquatiques tant en eaux douces que saumâtres et leurs biodisponibilités varient selon la physico-chimie du milieu. Alimentés en eau douce par leurs rivières affluentes en amont et en eaux salées par la remontée de la mer en aval, les estuaires sont des systèmes hydrologiques complexes particulièrement exposés aux contaminants (Even et al., 2007).

Aujourd'hui peu de données existent concernant les concentrations et les effets de ces contaminants sur les anguilles Américaines. Des études ont cependant montré une forte corrélation entre la concentration en composés organochlorés (notamment le pesticide Mirex) et la présence de malformations vertébrales et de foyers basophiles au niveau du foie des anguilles du Saint-Laurent (Hodson et al., 1994 ; Couillard et al., 1997).

Contrairement à l'anguille Américaine, l'impact des contaminants sur l'anguille Européenne a été plus largement étudié. Une étude avait mis en évidence une diminution de l'ordre de 7 % en 13 ans du stock de lipides accumulé dans le muscle d'anguilles jaunes vivant dans les bassins de l'Escaut, de la Meuse et du Rhin. (Belpaire et al., 2009). Les causes avancées pour expliquer cette perte de réserves lipidiques étaient notamment les PCBs retrouvés en forte concentration dans les muscles (Maes et al., 2008). Une diminution des stocks d'énergie chez les individus au stade jaune pourrait influencer négativement la reproduction des individus au stade argenté (Böetius 1980, Palstra et al. 2007, van den Thillart et al. 2007, Belpaire et al., 2009).

Des effets immuno-toxiques par une contamination au Hg ou au Pb, la réduction d'hormones thyroïdiennes et l'accroissement du glucose sanguin par le Cr et le Cu, ont déjà été décrits dans la littérature (pour revue Geeraerts et al, 2010). Dans l'estuaire de la Gironde, des concentrations élevées de Cu, Zn, Hg et Cd ont été relevées dans les reins et le foie de anguilles (Durrieu et al., 2005) plaçant l'anguille comme la seconde espèce la plus contaminée en métaux après le mulot porc (*Liza ramada*). De nombreuses études se sont penchées sur les effets du Cd sur l'anguille et ont révélé que ce métal perturbait la chaîne respiratoire mitochondriale (Pierron et al., 2007b), la défense contre le stress oxydant dans les branchies d'organismes au stade civelle. Il induirait également une consommation accrue des réserves lipidiques avec une réduction de l'indice corporel (Fulton²) chez les anguilles jaunes et pourrait avoir un effet délétère sur les capacités de maturation des anguilles argentées (Pierron et al., 2007b,c). Les travaux de Palstra et al. (2006) ont également mis en lumière, par la maturation artificielle d'anguilles argentées femelles, la remobilisation des PCBs « dioxin-like » contenus dans les tissus adipeux vers les œufs. Ce transfert serait à l'origine d'une augmentation du taux de malformation des larves.

² Indice de condition des poissons (indice de Fulton = (poids en g x 10⁵) / (longueur en mm)³

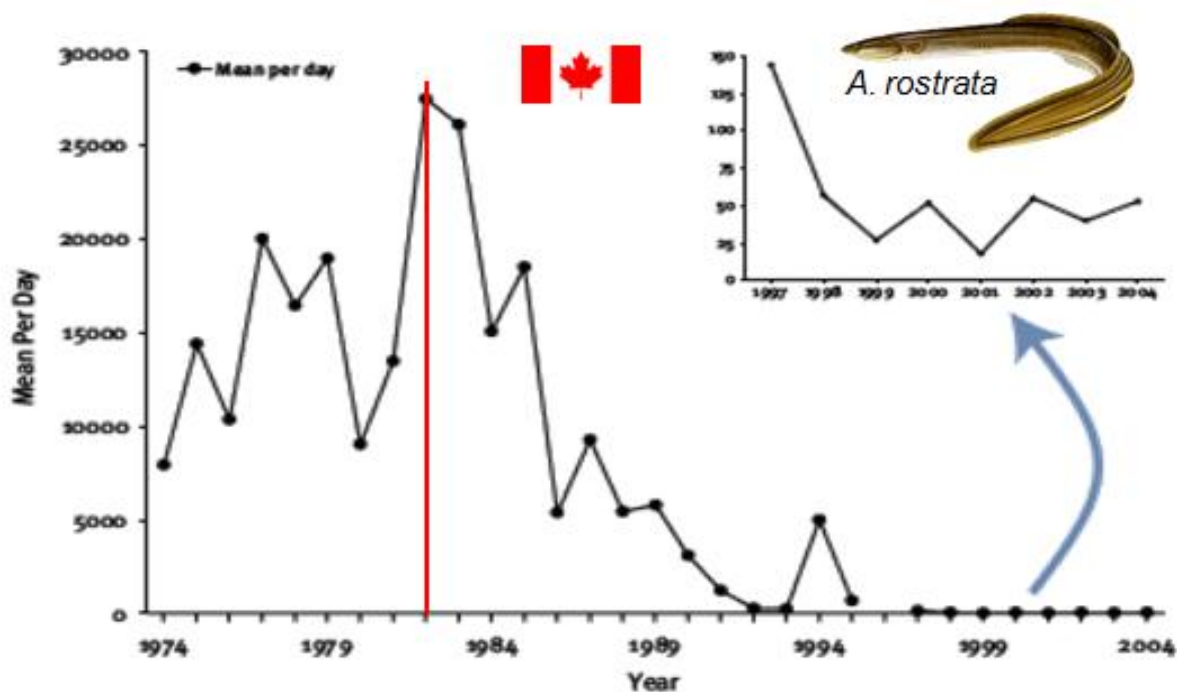


Figure 1.2 : Nombre d'anguilles jaunes comptées à une passe à anguille sur le fleuve St Laurent, Cornwall, Ontario

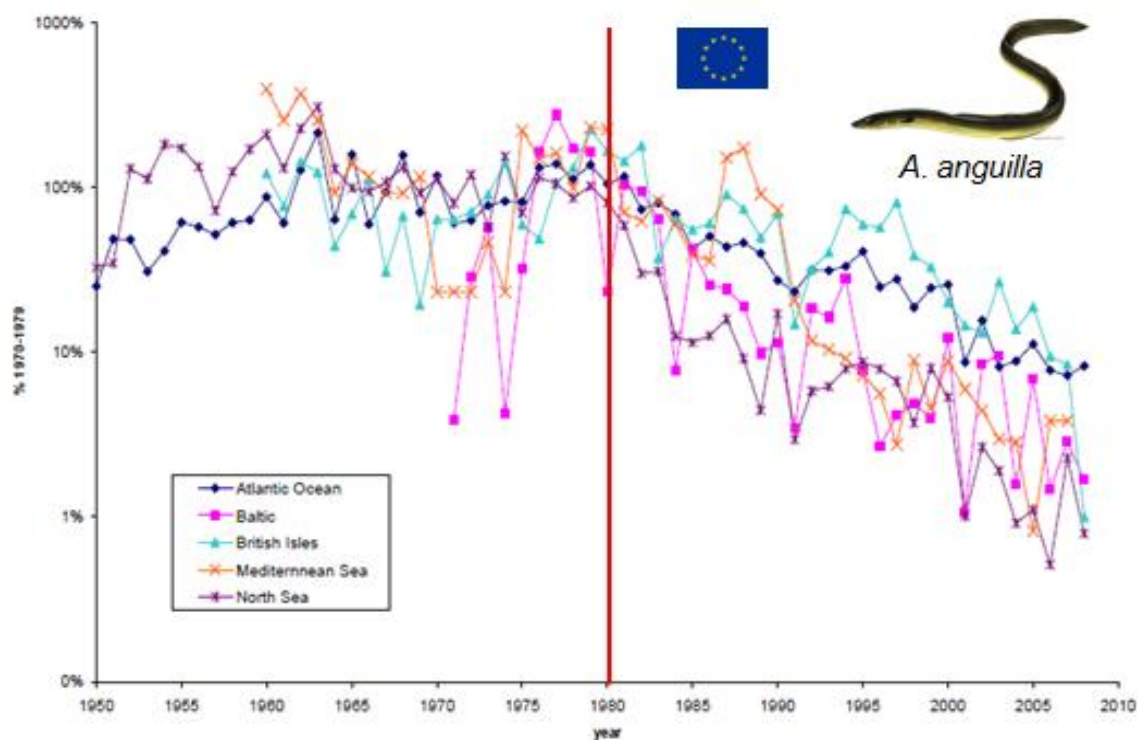


Figure 1.3 : Taux de recrutement en civelle d'*Anguilla anguilla*, sur différentes aires d'Europe

3. Etat des lieux des estuaires du Saint-Laurent et de la Gironde

3.1 L'estuaire du Saint-Laurent

Un estuaire est le tronçon où les eaux douces des fleuves se mélangent avec les eaux salées de l'océan. L'estuaire du Saint-Laurent mesure 150 km de long, a une largeur moyenne de 22 km et couvre une superficie de 3470 km². Il est caractérisé par une topographie sous-marine complexe, des marées de grande amplitude et une forte variabilité de conditions physico-chimiques (Couillard, 1982). Le débit annuel moyen du Saint-Laurent à Québec est d'environ 11 000 m³ par seconde. Les rivières majeures qui débouchent directement dans l'estuaire sont les rivières du Gouffre, Malbaie, du Sud, Ouelle et du Loup mais n'augmentent pas significativement le débit du fleuve en eau douce. Le fleuve Saint Laurent se trouve en sortie des Grands Lacs et est exposé aux polluants présents dans le bassin versant. Au bord de ses rives (Figure 1.4), sur près de 400 km, cinq millions de personnes y vivent et la décharge des eaux usées domestiques et industrielles représente une source importante de pollution (Pham et al., 1999). Plusieurs métaux traces sont présents à des niveaux importants dans les eaux de surface et les matières en suspension du fleuve Saint-Laurent (Cossa et al., 1998) ainsi que dans les organismes tels que les plantes (Hudon, 1998), les moules (Metcalfé et Charlton, 1990; Metcalfé-Smith et al, 1992) et différentes espèces de poissons (Ion et al., 1997; Chan et al., 1999; de Lafontaine et al., 2000).

Des études portées sur la bioaccumulation de métaux traces dans la moule zébrée *Dreissena polymorpha* ont été réalisées le long du fleuve Saint-Laurent et une forte variation d'accumulation dans la moule en fonction de la saison et du profil hydrologique a été décrit pour le Ca, Cd, Cr, Cu, Ni et Zn (Kwan et al., 2003). Concernant les composés organiques dans les sédiments, l'apport en PCBs, pesticides organochlorés (OCPs), dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) et ses métabolites, hexachlorobenzène (HCB) et en Mirex proviendrait essentiellement des lacs fluviaux et du lac Ontario comparativement à l'apport atmosphérique (Lebeuf et Nunes, 2004). La présence de ces composés reste cependant très inférieure aux lacs fluviaux (entre 12 et 39 fois moins importante) et diminuerait en direction de l'océan.

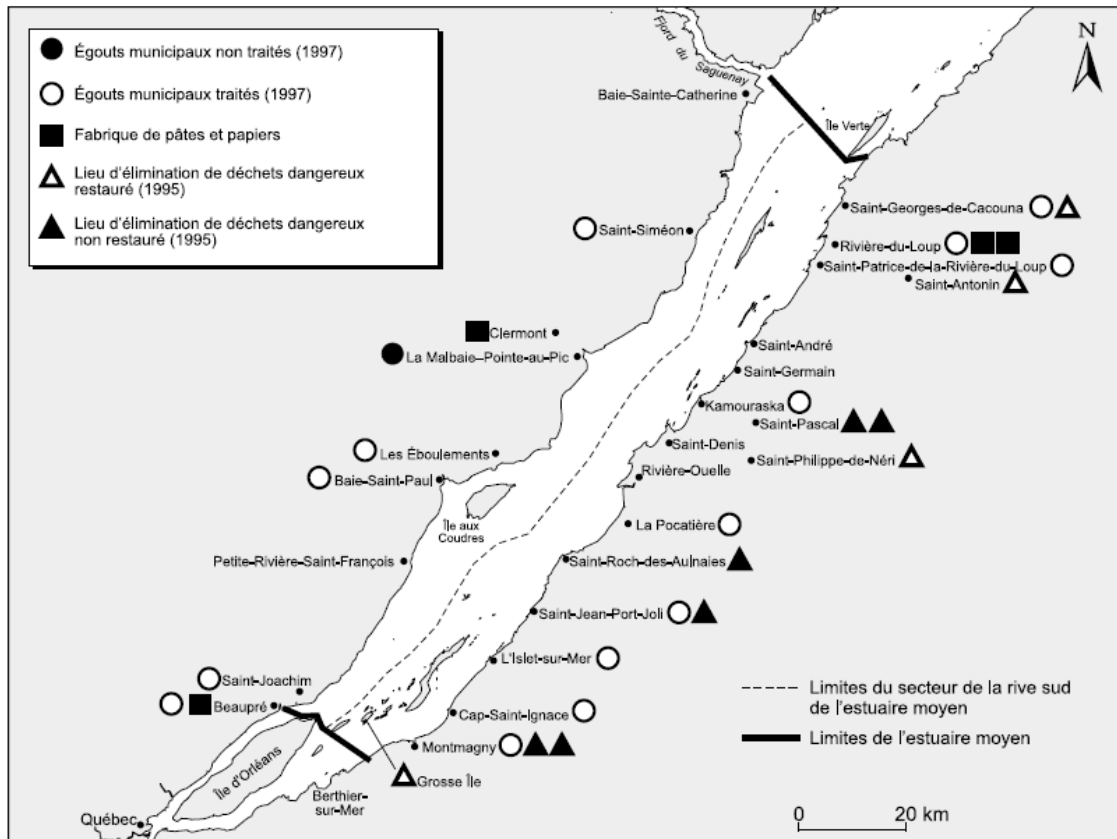


Figure 1.4 : Répartition des sources de pollutions dans l'estuaire du Saint-Laurent (Québec).

Source issue de Gagnon, 1998.

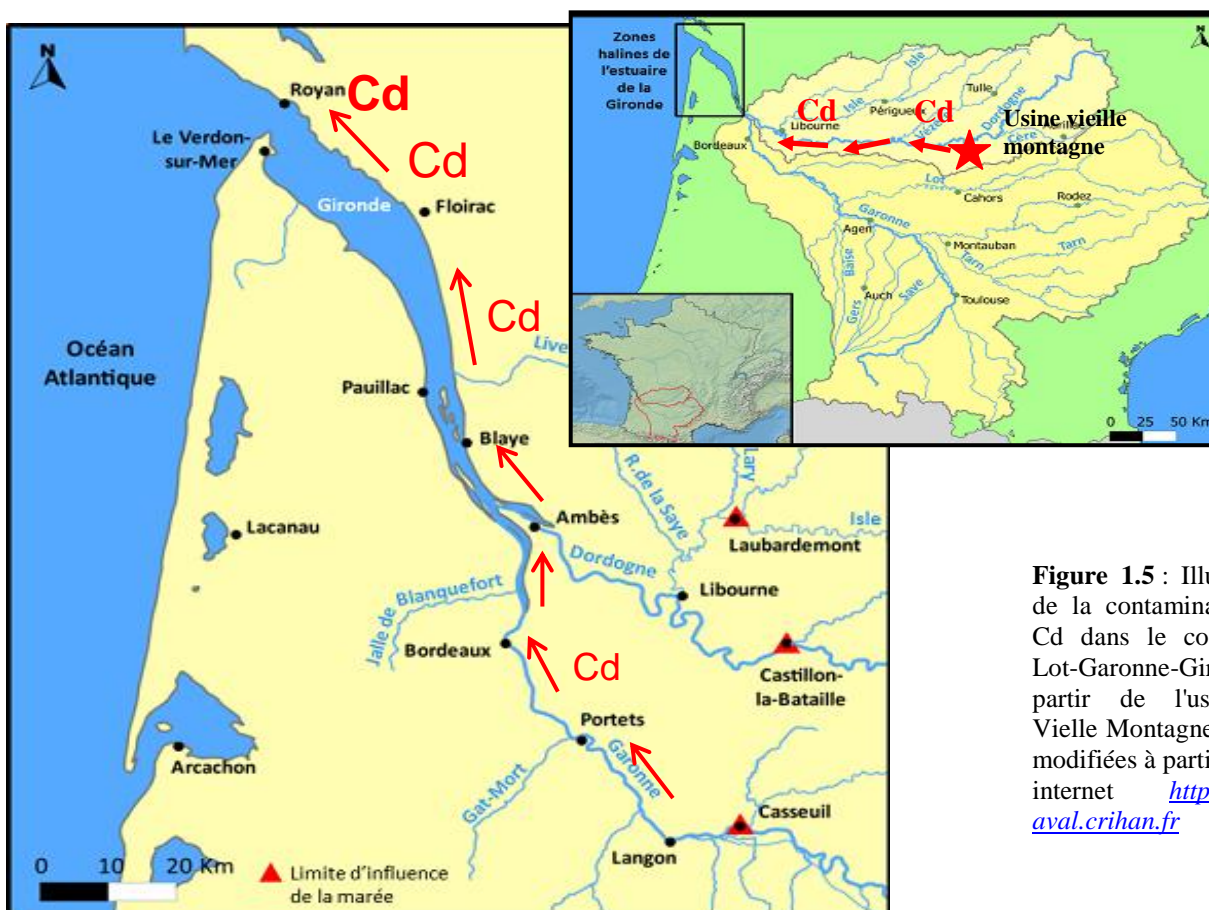


Figure 1.5 : Illustration de la contamination en Cd dans le continuum Lot-Garonne-Gironde à partir de l'usine de Vieille Montagne. Cartes modifiées à partir du site internet <http://seine-aval.crihan.fr>

3.2. L'estuaire de la Gironde

L'estuaire de la Gironde a une superficie de 635 km² et est influencé par l'océan Atlantique jusqu'à 150 km en amont de son embouchure. Il draine un bassin versant alimenté principalement par trois cours d'eau : la Garonne, la Dordogne et la rivière Isle (Schäfer *et al*, 2002). Les principaux apports et les flux de matières dans l'estuaire de la Gironde proviennent de la Garonne qui apporte une grande quantité de matières en suspension et de particules de carbone organique. Par la superficie importante de son bassin versant, l'estuaire de la Gironde subit fortement les activités anthropiques. La majeure partie de ce système est depuis longtemps polluée en Cd, Zn, Hg, Cu et Pb par le cours d'eau nommé « Riou Mort » qui pendant 50 ans a été soumis aux pollutions des activités minières et notamment de l'usine « Vieille montagne » située à Decazeville-Viviez (Schäfer *et al.*, 2002). Le Cd s'est particulièrement révélé comme un contaminant important provenant des activités d'extraction du zinc qui ont eu cours entre 1837 et 1986 en bordure de la rivière du Lot, près de Decazeville en Aveyron, et laissant échapper d'énormes quantités de Cd (Figure 1.5). Aujourd'hui le Cd se retrouve toujours en fortes concentrations dans les sédiments du Lot et de la Garonne mais aussi dans ceux de la Gironde. De plus les travaux de Tapie *et al.* en 2006 ont montré que l'estuaire était aussi marqué par une pollution organique notamment par les polybromodiphényléthers (PBDEs) utilisés comme retardateurs de flammes et par les PCBs. Interdit depuis la fin des années 1980s, les PCBs sont des composés issus exclusivement de l'industrie, ils sont chimiquement stables et donc peu biodégradables. Leur nature lipophile leur confère également un fort potentiel d'accumulation dans les tissus riches en lipides des organismes aquatiques et pouvant atteindre de très fortes teneurs dans les organismes situés au sommet de la chaîne trophique comme observé chez l'anguille Européenne (Tapie *et al.*, 2011).

Chapitre 2

Méthodologie

1. Choix des sites d'échantillonnage

L'objectif de l'échantillonnage *in situ* était de capturer des animaux sur des sites présentant un large panel de conditions tant anthropiques que naturelles. En effet, le but de ce travail était d'appréhender les effets des contaminants sur des individus « sauvages », i.e. issus du terrain, soumis à une pression anthropique. Ces animaux étant également prélevés dans des sites présentant des différences en terme de facteurs naturels comme la température, la salinité ou encore la présence de certaines maladies, l'objectif était en outre d'évaluer l'effet de ces facteurs sur le transcriptome afin de pouvoir les éliminer des patterns établis pour les contaminants.

Il était alors indispensable de réaliser des prélèvements d'individus à différents sites dans les estuaires et leurs affluents pour retracer toute la complexité du continuum. Comme décrit dans le chapitre 1, le continuum Lot-Garonne-estuaire de la Gironde est largement caractérisé par de fortes teneurs en métaux, tant dans les sédiments que dans les espèces y demeurant (Shäfer et al., 2002, Baudrimont et al., 2006 ; Durrieu et al., 2005, Pierron, 2007a) et décrit plus récemment pour les PCBs (Tapie et al., 2006, Tapie et al., 2011), produits pourtant interdits d'utilisation depuis plus de vingt ans. Le fleuve Saint-Laurent est quant à lui le siège d'une contamination d'origine organique (PCBs, pesticides et HAPs) et à moindre mesure en métaux avec le Hg sous sa forme méthylée (Gagnon, 1998 ; Abdelouahab et al, 2008). Pour chaque estuaire, quatre sites ont été sélectionnés pour leurs caractéristiques géochimiques et anthropiques particulières, illustrant ainsi tant un gradient de contamination que de conditions naturelles. Ainsi au Québec, la rivière Saint-Jean et la rivière Sud-Ouest ont été sélectionnées pour leur qualité de sites « propres » et le lac Saint-Pierre et le lac Saint-François ont quant à eux été sélectionnés car considérés comme « contaminés ». Pour les mêmes raisons, en France, les sites de Certes et Dordogne ont été choisis pour leur faible présence en contaminants et les sites au niveau de la Garonne et de la Gironde ont été considérés comme « contaminés ». L'ensemble des sites sont répertoriés sur la figure 2.1. Le travail en parallèle sur deux hydrosystèmes a permis d'élargir en outre la gamme de contaminants et de facteurs naturels, pour une même période d'échantillonnage.

La campagne d'échantillonnage des anguilles jaunes s'est déroulée au printemps de l'année 2011 et cela en parallèle dans les deux pays dans le but notamment de limiter un effet de la saison sur la physiologie des poissons et sur la pollution (Alberto et al., 2001). Il est important de souligner que lors de la campagne d'échantillonnage, les paramètres physico-chimiques de chaque site ont été relevés, i.e., la température, la salinité et le taux d'oxygène dans l'eau. Une

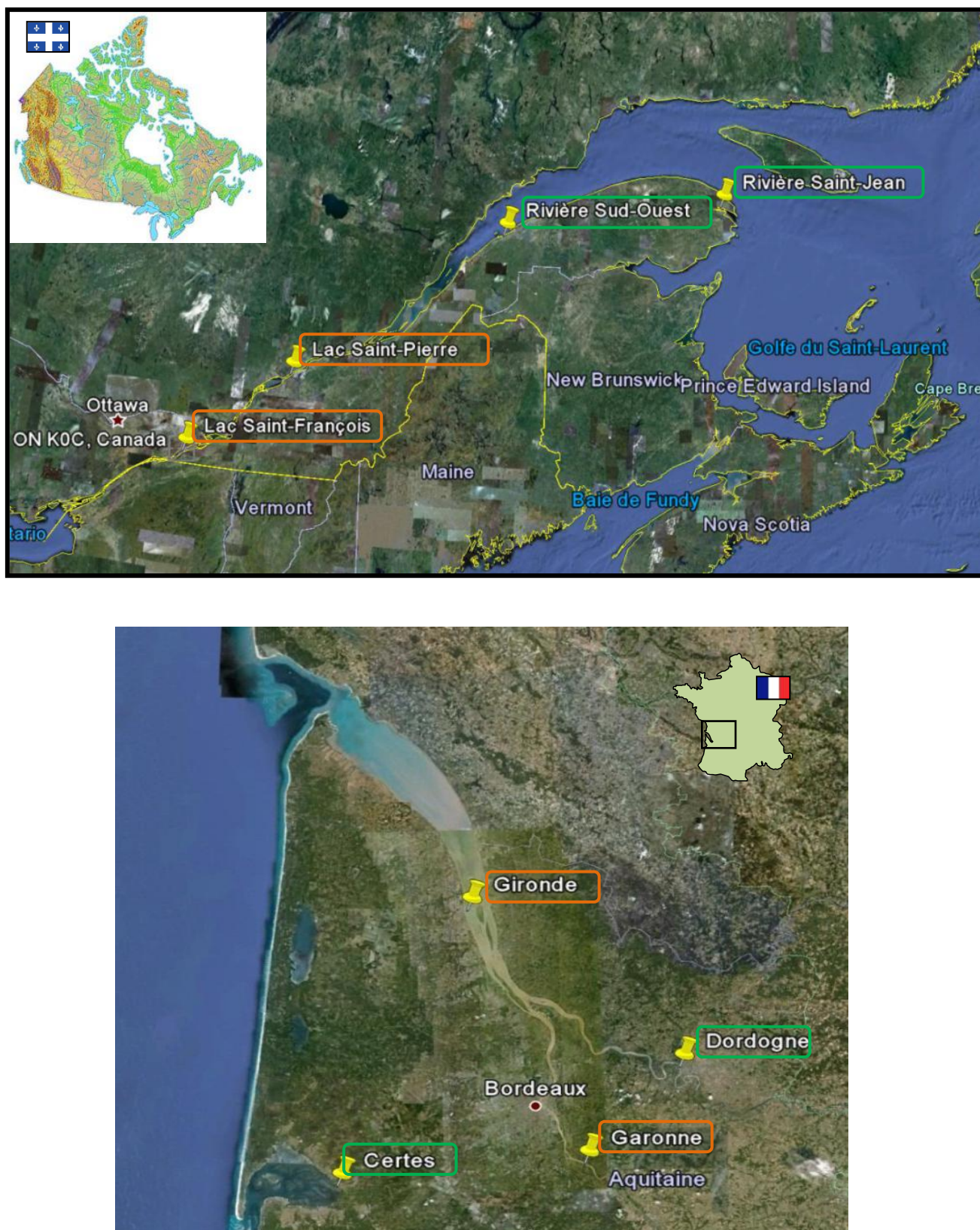


Figure 2.1 : Cartes des sites d'échantillonnage au Canada (en haut) et en France (en bas). Les sites considérés comme « propres » sont encadrés en vert, les sites considérés comme contaminés sont encadrés en orange.

attention particulière s'est portée sur la caractérisation de la condition de santé générale de chaque individu (Fulton, Kn, HSI³ ; données présentées dans l'article du chapitre 3). Pour chaque site, un total de 15 anguilles jaunes ont été prélevées. Suite à leur capture, les poissons étaient conservés dans de grands bacs à l'abri de la chaleur et de la lumière avec de l'eau provenant de leur site de capture. Des bulleurs électriques assuraient un apport continu en oxygène aux poissons. Après avoir noté les différents paramètres morphométriques et anatomopathologiques externes de l'anguille (longueur, poids, lésions externes...), le sacrifice a été fait par décapitation, sans anesthésie. L'utilisation d'anesthésiants a en effet montré une influence sur l'expression des gènes (Renault et al., 2011), ce qui pouvait induire un biais pour les futures analyses. Le détail des données géographiques des sites et des informations sur les méthodes de pêches et les dates des prélèvements sont décrits en tableau 2.1.

Tableau 2.1 Informations générales sur les sites d'échantillonnage

<i>Sites</i>	<i>Coordonnées géographiques</i>	<i>Période 2011 d'échantillonnage</i>	<i>Méthode de capture</i>	<i>T°C</i>	<i>S‰</i>	<i>Saturation en oxygène %</i>
St Jean	48_51_40 N 64_28_47 O	14-15 juin	verveux	17	1,9	NA
Sud-Ouest	48_22_27 N 68_43_02 O	28-29 juin	pêche électrique	19,1	16,5	96,8
St Pierre	45_09_19 N 74_23_05 O	5-6 juillet	verveux	12	0,11	NA
St François	46_19_74 N 72_32_30 O	20-21 juillet	verveux	22	0	60
Certes	44_41_18 N 1_1_39 O	24 Mai	verveux	21,9	19,9	74,65
Dordogne	44_54_30 N 0_15_01 O	7 Juin	verveux	22,2	0,32	86,5
Gironde	45_12_07 N 0_43_35 O	8 Juin	Chalut	21,3	7,78	86,5
Garonne	44_43_51 N 0_28_05 O	10 juin	verveux	21,4	0,13	82,62

³ L'indice de Fulton et du Kn sont des indices de condition de santé générale basé sur le rapport Taille/Poids
Le HSI est l'indice hépato-somatique, basé sur le rapport masse foie/ masse individu

2. Exposition en laboratoire

Dans le but d'attribuer une signature transcriptomique pour chaque contaminant et facteur naturel, des expositions d'anguilles au stade jaune ont été réalisées.

2.1. Choix des anguilles jaune de Certes

L'ensemble des expérimentations en laboratoire a été réalisé à la station marine d'Arcachon et à partir d'individus sauvages prélevés sur le domaine de Certes, i.e. sur le site le moins contaminé. En effet, il n'existe plus en France depuis le début des années 1980 d'unités de grossissement de civelles du fait notamment des problèmes sanitaires difficilement contrôlables dans les bassins aquacoles. De plus, des signes de dérives physiologiques sexuelles, où une forte prédominance de mâles, avaient été observés (Rapport du Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, 2012). En outre, l'objectif de l'expérimentation en laboratoire était de refléter les conditions naturelles. Nous avons ainsi choisi d'utiliser des anguilles sauvages issues de la même population échantillonnée pour l'étude du séquençage du transcriptome.

Le choix du site de pêche des anguilles destinées aux expérimentations s'est légitimement tourné vers le site de Certes, site considéré comme « propre » de notre étude dans le but d'obtenir des individus en bonne santé et le plus faiblement contaminés. Ce site est une ancienne propriété piscicole située dans la commune d'Audenge, aujourd'hui classé comme une aire de gestion des habitats et des espèces par l'UICN (Union International pour la Conservation de la Nature, Commission mondiale des aires protégées) et géré par le conservatoire du littoral. Un seul pêcheur est autorisé sur ce site, Monsieur J-F Guiese, à qui nous avons demandé de pêcher les anguilles jaunes pour l'ensemble des expérimentations.

2.2. Mise en conditions expérimentales des anguilles

2.2.1. Stabulation des anguilles

Une fois les anguilles pêchées sur le site, ces dernières étaient ramenées à la station marine dans des bacs contenant des tissus humides et recouverts de sacs noirs pour les préserver de la lumière, les anguilles étant des animaux lucifuges. Les anguilles étaient ensuite mises en acclimatation à l'animalerie de la station dans des bacs alimentés directement par l'eau provenant du bassin d'Arcachon, par des pompes situées à proximité de la station marine. L'objectif de les maintenir en eau de mer était de limiter dans un premier temps un choc osmotique trop important du fait qu'elles venaient d'un milieu saumâtre (autour de 17 ‰ à

Certes) mais aussi pour diminuer la prolifération de parasites potentiels dont *Anguillicola crassus* se développant moins aisément en milieu salin (Kirk et al., 2000). Les anguilles n'ont été nourries qu'au bout d'une semaine après leur date d'arrivée au laboratoire. Durant cette période de stabulation, un très faible taux de mortalité a été observé, période durant laquelle également, la salinité a été progressivement abaissée (5‰ en moyenne tous les 3 jours) pour les acclimater aux futures conditions expérimentales. Durant cette période, les anguilles ont été nourries *ad libitum* avec des moules décortiquées et congelées, et cela, tous les deux jours. Le reste de la nourriture était enlevé chaque lendemain de nourrissage. Après 30 jours de stabulation dans les bacs de l'animalerie, les animaux ont été transférés dans les bacs expérimentaux.

2.2.2. Présentation générale des conditions expérimentales

Le système expérimental était composé de bacs constitués de fibre de verre, matière inerte pour limiter l'adsorption des contaminants sur les parois. La hauteur d'eau dans les bacs était fixée à 25 cm pour un volume total de 216 litres. La salinité a été fixée à 5‰ (salinité moyenne observée dans les sites d'échantillonnages), établie par un apport contrôlé en eau saumâtre (provenant du bassin d'Arcachon) et en eau douce (eau de la ville préalablement déchlorée par bullage). Le mélange eau douce et saumâtre s'effectuait dans une colonne en PVC (H=170cm ; R=8cm), équipée de bulleurs pour assurer l'oxygénation de l'eau. L'eau était ensuite distribuée dans l'ensemble des différents bacs d'expositions au moyen de tuyaux en PVC raccordés à la colonne et aux bacs. Le système d'alimentation en eau était ouvert, renouvelant les bacs en eau « propre » 1 fois par jour. Concernant le maintien de la température, celle-ci a été assurée par une résistance chauffante au fond de chaque bac réglée d'abord à la température des bacs de l'animalerie puis amenée progressivement à la température souhaitée, soit 23°C. Cette température correspondait à celle retrouvée en moyenne dans les sites d'échantillonnages. L'oxygénation des bacs étaient assurés par des bulleurs placés dans chaque bac. L'oxygénation et le nettoyage de l'eau des bacs étaient également assurés par des pompes filtrantes internes Eheim® assurant une filtration mécanique et biologique (ensemencement de bactéries dénitrifiantes). Enfin, du fait de son caractère lucifuge, au fond de chaque bac se trouvaient des tubes en PVC qui constituaient des caches pour les anguilles et les protégeaient ainsi de la lumière artificielle de la salle expérimentale.

La nourriture destinée aux anguilles en expérimentation était constituée de vive, un poisson de mer acheté à la criée au port d’Arcachon. La vive a été privilégiée par rapport aux moules décortiquées du fait que ces dernières n’étaient disponibles que sous la forme congelée. La préparation de la nourriture standardisée pour l’ensemble des expositions impliquait la décongélation puis la re-congélation des moules. Ce processus n’était pas envisageable du fait du risque de prolifération de bactéries dans la nourriture.

Pour la préparation du poisson, les viscères étaient retirés du fait de leur potentiel à accumuler les polluants, ainsi que la tête et la nageoire caudale. Le reste était broyé avec une préparation d’agar-agar (0,8%) et d’huile de colza (1,3%) pour former une pâte homogène. Cette pâte, réservée à -20°C, était ensuite distribuée au fur et à mesure du temps de l’expérimentation. Tous les individus étaient soumis à un régime alimentaire correspondant à 7.5 % (nourriture humide) de leur masse totale. Durant la phase d’acclimatation les anguilles ont été nourries le soir, avec la même pâte « témoin » i.e., non contaminée, durant 3 semaines avec une alternance jour/nuit de 12h. L’ensemble du dispositif expérimental est illustré à la figure 2.2.

2.2.3. Suivis des paramètres physico-chimiques et de prise de nourriture

Le suivi physico-chimique a été effectué tous les deux jours à l’aide d’un conductimètre 300iWTW pour le contrôle de la salinité et de la température et d’une sonde pH 315iWTW pour le contrôle du pH dans l’eau.

Concernant le suivi de la prise de nourriture, les animaux étaient nourris le soir. Le lendemain matin, les restes de nourriture non consommés par les anguilles étaient récupérés puis déshydratés et pesés pour contrôler le taux d’ingestion des animaux. Le calcul était basé sur la masse sèche de la quantité de nourriture introduite au départ dans chaque bac auquel était soustraite la masse sèche de la nourriture récupérée après nourrissage, donnant ainsi la masse de nourriture consommée par le groupe d’anguille de chaque bac.

2.3. Expositions des anguilles jaunes aux contaminants métalliques et organiques

L’ensemble des contaminants utilisés pour les expérimentations en laboratoire ont été choisis en fonction des gradients de concentrations retrouvées dans les organes des anguilles échantillonnées dans les huit sites Canadiens et Français. Chaque exposition a duré 45 jours.

2.3.1. Exposition au cadmium – Cd

Comme décrit dans le chapitre précédent, si dans l'estuaire du St Laurent la contamination au Cd reste peu marquée, *a contrario* la présence du Cd en Gironde est historique.

La contamination au Cd a été réalisée via la voie directe, en d'autres termes, via le métal dissous dans l'eau. La biodisponibilité du Cd sous sa forme Cd^{2+} (sa forme la plus biodisponible; Calamari et al., 1980, Paquin et al., 2000) à une salinité fixée à 5 ‰ est de 26 %, calculée à partir du modèle de l'ion libre. Dans le but de se rapprocher des conditions naturelles (soit $\approx 0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ au niveau de la Gironde (Baudrimont et al., 2006)), et compte tenu de sa biodisponibilité pour les organismes, les concentrations appliquées ont été de $0,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ et $4 \mu\text{g.L}^{-1}$. Le facteur 10 entre ces deux concentrations permettait d'obtenir une valeur haute et basse de concentration en Cd dans le but de couvrir une gamme des différentes concentrations pouvant être retrouvées sur le système fluvial de l'estuaire de la Gironde. La contamination de l'eau en Cd a été réalisée à l'aide d'une pompe péristaltique, diffusant en continu une solution mère (une pour chaque concentration), dans le tuyau d'alimentation en eau saumâtre du bac. Les anguilles ont été nourries avec de la nourriture non contaminée (nourriture témoin), et la quantité fixée selon la masse moyenne des anguilles de cette condition.

2.3.2. Exposition au méthylmercure – MeHg

La forme méthylée du mercure (MeHg) est la source majoritaire de la contamination des poissons. En effet, le MeHg s'accumule dans les organes lipophiles comme le muscle et se bioamplifie le long de la chaîne trophique (pour revue Downs et al., 1997).

Le choix des concentrations en MeHg s'est fait à partir des données de concentrations dans les huîtres (proies potentielles des anguilles) issu du réseau ROCCH⁴ (<http://envlit.ifremer.fr>), la nourriture a été contaminée à $0.5 \mu\text{g.g}^{-1}$ et $5 \mu\text{g.g}^{-1}$ en poids sec (PS) de nourriture. La contamination a été réalisée à partir d'une solution mère de méthylmercure et diluée à la concentration souhaitée avec de l'huile de colza puis mixée avec la vive broyée et l'agar-agar.

2.3.3. Exposition aux polychlorobiphényles - PCBs

La forte présence de PCBs dans le muscle des individus échantillonnés dans la Gironde et dans la Garonne, a conduit à réaliser des expositions d'anguilles à ces substances. Une solution de pyralène, regroupant les 7 PCBs classés prioritaires (PCB 28, 52, 101, 138, 153, 180 et 209) a été utilisée. Ces derniers sont utilisés dans l'évaluation de la norme de la

⁴ Réseau d'Observation de la Contamination Chimique du littoral

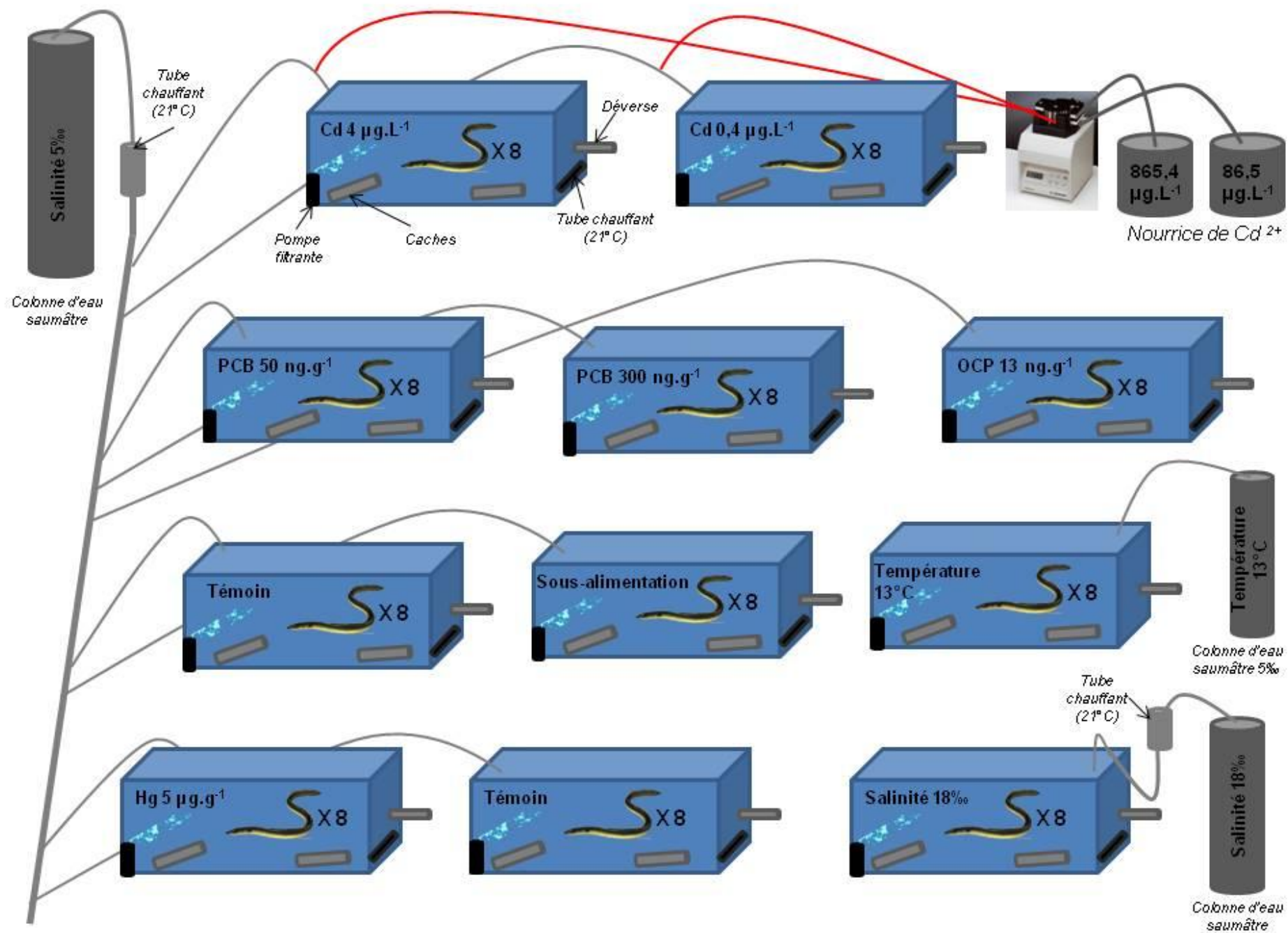


Figure 2.2 : Schéma des expérimentations réalisées sur l'anguille Européenne *Anguilla anguilla* au stade jeune

qualité environnementale en France. Compte tenu du caractère fortement lipophile de ces composés et de la place de l'anguille dans la chaîne alimentaire, la voie trophique a été choisie. La quantité de pyralène pour contaminer les boulettes de poissons a été calculée à partir de la concentration du PCB 153, les concentrations appliquées se sont appuyées sur les concentrations en PCB retrouvées dans les proies présumées des anguilles au niveau de la Gironde (Tapie et al., 2011) soit une concentration fixée à 50 ng.g^{-1} PS de nourriture pour la concentration basse et 300 ng.g^{-1} PS pour la valeur haute. Pour cette exposition, leur nourriture a été mixée avec de l'agar-agar et une solution de PCBs qui avait été préalablement mélangée dans de l'huile alimentaire puis conservée à -20°C . La quantité de nourriture a été fixée selon la masse moyenne de l'ensemble des anguilles de cette condition.

2.3.4. Exposition aux pesticides organochlorés - OCPs

La source des pesticides organochlorés est principalement l'agriculture et représentent un groupe important des polluants organiques persistants. Le choix de la contamination aux pesticides organochlorés a été motivé par leur forte présence dans les deux estuaires.

Ainsi, pour notre étude, les concentrations choisies pour la contamination a été de 13 ng.g^{-1} (valeurs retrouvées dans les huîtres en aval de l'estuaire de la Gironde ; données du ROCCH) et 130 ng.g^{-1} PS de nourriture afin de représenter une large gamme de concentration pouvant être retrouvées en milieu naturel. La solution d'exposition a été réalisée à partir de solutions pures des différents métabolites de l'insecticide DDT (Dichlorodiphényltrichloroéthane), le 2,4' DDE, 4,4' DDE + dieldrin, 4,4' DDD, 2,4' DDT, 4,4' DDT, ainsi que le lindane et le transnonachlor qui sont également des insecticides organochlorés. Cette solution a été mélangée au préalable avec de l'huile de colza puis mixée à la chair de vive et de l'agar-agar et conservée à -20°C . De la même façon que pour les autres conditions, la quantité de nourriture a été fixée selon la masse moyenne des anguilles.

2.3.5. Exposition à la sous-alimentation

Les anguilles étant soumises aux variations de leur apport en nourriture en milieu naturel, nous avons choisi de les soumettre à un régime restrictif pour tester son impact sur l'expression des gènes. L'apport alimentaire (en masse humide) a été fixé à 2% de leur poids total contre 7.5% pour les autres conditions expérimentales soit 3,75 fois moins nourries que les autres groupes. Les anguilles ont été nourries avec la nourriture non contaminée, la quantité de nourriture a été fixée selon la masse moyenne des anguilles pour cette condition.

2.3.6. Exposition à la salinité

Etant donné les changements de salinité d'amont en aval dans les deux estuaires, le choix d'exposer les anguilles à une salinité différente s'est imposé. De plus, il a déjà été montré que chez certains poissons euryhalins, la salinité pouvait influencer l'expression des gènes, tel que l'expression du gène *hsp70* (*heat shock protein 70*) tant au niveau des branchies que du foie (Deane et Woo, 2004). L'exposition à une eau douce n'a pas été retenue du fait du risque trop élevé d'une prolifération de parasites dans les anguilles et conduisant à des maladies difficilement maîtrisables sans l'intervention d'antibiotiques. L'ensemble des bacs expérimentaux ayant été soumis à une salinité fixée à 5‰, nous avons choisi d'exposer les anguilles à une salinité de 18‰ pour cette condition. Cette valeur a été choisie en fonction des sites Sud-Ouest et Certes dont la salinité atteignait 16,5 et 19,9‰ respectivement. Une colonne d'eau a été dédiée par conséquent exclusivement pour ce bac expérimental, le reste des bacs étaient alimentés en eau par une seule même colonne d'eau maintenue à 5‰. Les anguilles ont été nourries avec la nourriture témoin à 7.5% de la masse moyenne des anguilles de cette condition.

2.3.7. Exposition à une faible température

Alors que les oiseaux et les mammifères maintiennent leur température constante de façon indépendante aux variations extérieures, les poissons sont des animaux ectothermes (à sang froid) et ont une température corporelle égale à celle du milieu dans lequel ils vivent. La température joue alors un rôle prépondérant sur leur métabolisme général (Hazel et al., 1995 ; Dolomatov et al., 2013). Il était donc pertinent d'exposer les poissons à une température différente. Etant donné que la température choisie pour l'ensemble des conditions expérimentales était de 23°C, leur température optimale de croissance (Sadler, 1979), il était difficile d'exposer à une température excessivement plus chaude. De plus, les valeurs de température mesurées lors de la campagne de pêche en 2011 montraient des températures plus basses notamment pour les sites de Québec autour de 12°C, nous avons alors choisi d'exposer les anguilles à 13°C. Les anguilles ont été nourries avec la nourriture témoin à 7,5% de la masse moyenne des anguilles présentes dans ce bac.

2.4. Maturation artificielle d'anguilles femelles au stade argenté

2.4.1. Préambule

Pour mieux comprendre les démarches qui seront décrites dans les deux prochains paragraphes, il était juste de donner des informations sur les processus hormonaux régissant la maturation sexuelle des anguilles femelles argentées. Chez l'anguille, comme chez l'ensemble des vertébrés, la maturation des gamètes est contrôlée par le système nerveux et endocrinien, le long de l'axe cerveau-hypophyse-gonade. Plusieurs hormones interviennent dans la maturation des gonades : l'hormone GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone), la FSH (Follicle Stimulating Hormone), la LH (Luteinizing Hormone) et enfin des hormones sécrétées par les cellules folliculaires, comme l'estradiol. Ces cellules entourent les ovocytes et permettent leur maturation. Cependant, les événements naturels conduisant à la maturation sexuelle de l'anguille restent, à ce jour encore, mal connus et la capture d'anguilles argentées sexuellement matures dans l'océan Atlantique demeure un échec. Pour l'anguille européenne, les mécanismes entraînant leur maturation sexuelle restent mal connus et encore à ce jour, les expériences de maturation et de fertilisation artificielle n'ont donné que des larves restant viables quelques jours seulement (Pedersen, 2003 ; Pedersen, 2004).

Des études de maturation des gonades des anguilles femelles européennes au moyen d'injections d'extraits hypophysaires de carpe avaient mis en évidence une augmentation de la testostérone, de l'oestradiol, de la LH et de la GnRH. Néanmoins cette sécrétion n'est pas directement due à la stimulation directe du cerveau par l'injection de CPE, mais plutôt par un rétrocontrôle négatif des stéroïdes (notamment l'estradiol) sécrétés par les gonades au cours de la maturation (Dufour 1989, Dufour, 1994, Vidal et al., 2004, Schmitz et al., 2005). L'anguille argentée, au niveau des côtes européennes, est encore à un stade pré-pubère et deviendra sexuellement mâture seulement durant sa migration transocéanique vers son lieu de reproduction. L'injection d'hormones en laboratoire est donc indispensable pour induire la maturation de ces poissons.

La maturation sexuelle d'anguilles argentées femelles en laboratoire a été réalisée à la station expérimentale de Saint-Seurin sur l'Isle, station rattachée à l'IRSTEA de Bordeaux-Cestas. Cette expérience a été mise en œuvre par Sarah Bureau du Colombier dans le cadre de son post-doctorat au cours du projet IMMORTEEL. Au sein de ce travail, j'ai participé à l'ensemble des dissections des anguilles, réalisées au cours des 4 mois de l'expérience de maturation et travaillé sur l'aspect transcriptomique au moyen de la puce ADN sur les gonades des anguilles maturées

2.4.2. Stratégie d'échantillonnage

L'échantillonnage des anguilles argentées a été réalisé au cours de l'hiver 2012-2013 au moment de la dévalaison des anguilles vers l'océan Atlantique. Les anguilles ont été prélevées au niveau du site de Certes, le site de référence de notre étude, mais également au niveau de l'estuaire de la Gironde, site considéré comme le plus contaminé. Au total 40 individus ont été échantillonnés à Certes et 23 au niveau de l'estuaire de la Gironde. Tous les individus ont été ensuite ramenés à la station expérimentale de Saint Seurin sur l'Isle.

2.4.3. Mise en conditions expérimentales

Une fois les anguilles arrivées à la station expérimentale, ces dernières ont été identifiées à l'aide d'un pit-tag (une micro-puce fournissant un code unique pour chaque individu). A cette étape les anguilles ont été anesthésiées puis placées ensuite dans une eau saline proche de la salinité de leur site d'échantillonnage respectif. La salinité a ensuite été progressivement augmentée après deux semaines de stabulation dans les bacs pour atteindre une salinité supérieure à 30 ‰, salinité de l'océan. La température a été fixée à 15°C, (température relevée lors de l'échantillonnage) et ce, jusqu'à la fin de l'expérience. A la fin de la période d'acclimatation des anguilles, ces dernières ont été redistribuées dans différentes unités expérimentales, mélangeant les anguilles provenant des deux sites afin de s'abroger de tout « effet bac ». Une activité de nage a été simulé par un courant d'eau, dont la vitesse variait entre 13 et 15 km/h, vitesse correspondant à la vitesse moyenne mesurée chez des anguilles européennes suivies par des émetteurs durant leur migration (Aarestrup et al., 2009). Chaque bac était équipé d'un filtre biologique et mécanique muni en sortie d'un appareil UV assurant la stérilisation de l'eau. Tout au long de l'expérience, les paramètres physico-chimiques tels que la température, la salinité et le taux d'oxygénation ont été relevés en continu. Dans le but de recréer les conditions de leur migration transocéanique, les anguilles ont été maintenues dans le noir complet et n'ont pas été nourries durant les 4 mois de l'expérience.

Afin d'induire le processus de maturation artificielle, une injection intra-péritonéale (sans anesthésie) hebdomadaire d'extrait hypophysaire de carpe (CPE) a été nécessaire. La concentration en CPE, fixée à 20 mg de poudre par kilogramme d'anguilles, a été établie en accord avec la littérature (Dufour et al., 1983 ; Dufour et al., 1989 ; Dufour, 1994 et Durif et al., 2003).

Pour Certes et Gironde, huit et cinq individus respectivement ont été prélevés et disséqués à T0, marquant le début de l'expérience. Le reste des individus a été ensuite prélevé

au bout de 11 semaines, soit après 10 injections de CPE. Les échantillons de gonades destinés à l'analyse transcriptomique ont été conservés dans du *RNAlater* et placés à -20°C.

3. Les méthodes d'analyses

3. 1. Stratégie de construction de la puce ADN

3.1.1. Le séquençage haut débit

L'avènement au milieu des années 2000 du séquençage haut débit a permis de démocratiser leur utilisation dans différents domaines dont l'écotoxicologie. Dans ce travail de thèse, le séquençage du transcriptome des anguilles a été réalisé à l'aide de la technologie Illumina HiSeq 2000.

3.1.1.1. Principe

Cette méthode de séquençage est réalisée sur un support solide contrairement à la méthode de Sanger qui se faisait en solution. Dans les deux cas, le séquençage est réalisé par une amplification par polymérisation du fragment ADN. L'amplification du fragment se fait alors directement sur le support solide pour la méthode Illumina. L'ADN va subir différentes étapes avant d'être amplifié et séquencé. L'ADN est tout d'abord fragmenté puis ramené à bout franc (générer des extrémités non cohésives). Une base A est ajoutée à l'extrémité 3' et des adaptateurs doubles brins (ayant un T à leur extrémité 5') sont fixés au fragment ADN. Ces ADN modifiés constituent une « librairie » qui va ensuite pouvoir être séquencée dans un appareil de séquençage automatisé. Les fragments sont d'abord dénaturés (simple brin) puis hybridés sur une lame pour pouvoir être séquencés. Les adaptateurs préalablement ligés permettent (i) la fixation de fragments d'ADN simple brin à des amorces, elles aussi simple brin, qui sont fixées sur le support solide et (ii) d'initier l'amplification de ces fragments. L'élongation par l'ADN polymérase de l'amorce liée au fragment simple brin va permettre l'obtention d'un fragment double brin qui va à nouveau être séparé. Le simple brin d'ADN nouvellement formé va ensuite se lier à une autre amorce fixée sur le support en formant un pont et va subir une nouvelle étape d'amplification suivie d'une étape de dénaturation pour former un autre pont. Cette étape d'amplification des fragments d'ADN, appelée « Cluster Generation », va être réalisée 35 fois afin d'obtenir une quantité suffisante de chaque molécule d'ADN pour réaliser le séquençage. Le séquençage commence par la liaison sur les fragments simple brin d'une amorce. L'ADN polymérase va alors venir se fixer sur le duplex formé et va ajouter à cette amorce un nucléotide modifié portant un fluorochrome et un

terminateur réversible permettant le blocage de l'ajout d'un autre nucléotide. Chaque nucléotide est doté d'un fluorochrome spécifique et l'excès de nucléotides non incorporé est éliminé par lavage. Le fluorochrome est ensuite excité par des lasers, l'émission de la lumière est enregistrée par une caméra, lumière qui sera traduite ensuite par traitement informatique en un nucléotide et *in fine* permettra de reconstituer la séquence nucléotidique du fragment. A la fin de chaque étape d'incorporation d'un nucléotide et de l'excitation du fluorochrome associé, le clivage du terminateur réversible et du fluorochrome permet la poursuite du séquençage. Une fois l'ensemble des séquences identifiées, l'assemblage de ces séquences va permettre la construction du génome.

3.1.1.2. Séquençage du transcriptome des anguilles

La démocratisation du séquençage par son coût de plus en plus faible a permis le développement du séquençage du transcriptome (Ekblom et Galindo, 2011), c'est-à-dire de l'ensemble des ARNm chez un individu à un instant t. En effet à partir d'un ARNm, précurseur des protéines, il est possible de le rétro-transcrire en une molécule d'ADN simple brin appelé ADN complémentaire (ADNc) puis de le transformer en ADNc double brin pour pouvoir y insérer les adaptateurs et réaliser le séquençage de cet ADNc double brin de la même façon que pour une molécule d'ADN décrit précédemment. Dans une démarche écotoxicologique pour comprendre les réponses des individus face à une contamination, ces technologies à haut débit ont été utilisées pour étudier le transcriptome d'espèces prélevées dans leur milieu naturel comme la perchaude (Pierron et al., 2011). La force et l'originalité de cette approche est d'explorer l'ensemble des expressions géniques sans *a priori* et sélectionner les gènes qui seront, chez des individus de terrain, affectés par les facteurs environnementaux, anthropiques ou naturels. Plus précisément, dans la présente étude, dans le but de comprendre les effets des contaminants sur des individus vivant en milieu multi-contaminé et soumis aux variations physico-chimiques, nous avons utilisé cette technique pour séquencer en simultané le transcriptome d'anguilles Américaines et Européennes issues de différents sites naturels présentés plus tôt dans ce chapitre. Le principe du séquençage par la méthode Illumina et son application aux deux espèces d'anguilles sont illustrés en figure 2.3.

Dans notre démarche, le foie a été choisi car il est le siège d'un grand nombre de réactions métaboliques (métabolisme des xénobiotiques, détoxification, métabolisme énergétique) et est le siège d'une importante accumulation de métaux non essentiels comme le cadmium (Al-

Yousuf et al., 2000, Gonzalez et al., 2006). Cet organe est également la cible privilégiée des composés lipophiles comme les PCBs (Bachour et al., 1998). Le stade somatique de l'anguille a été choisi pour cette étude car il représente la phase de croissance de l'anguille, où cette dernière va accumuler des graisses qui serviront plus tard à son développement sexuel, mais aussi des contaminants métalliques et organiques présents dans les écosystèmes aquatiques (McHugh et al., 2010). Pour le séquençage du transcriptome, 48 individus ont été échantillonnés, soit six individus par site. Les échantillons de foie destinés au séquençage ont été conservés à -20°C dans du RNAlater.

La construction de la librairie des ADNc des 48 individus se différencie de celle présentée précédemment par l'ajout, à la fin des séquences fragmentées des ADNc, de code-barres (petites séquences nucléotidiques ajoutées à la fin de la séquence des ADNc) qui ont permis l'identification à la fin du séquençage des fragments issus de chaque individu. De cette façon, nous avons obtenu les niveaux d'expression de l'ensemble des gènes pour chaque individu par la quantification du nombre de fois où la séquence d'un ARN a été séquencée chez un individu donné. La construction de la librairie a été réalisée par Fabien Pierron au laboratoire du Pr Louis Bernatchez à l'université Laval à Québec. Le séquençage a été réalisé à Genome Quebec innovation Center (Université McGill à Montréal, Québec, Canada). L'assemblage et l'annotation du transcriptome ont quant à eux été réalisés par un bioinformaticien, Eric Normandeau (Université Laval, Québec).

3.1.2. Elaboration de la puce à ADN

La technologie des puces à ADN a été développée à la fin des années 1990 sur des lames de verre, un support inerte, sur lequel sont fixées des séquences d'ADN simple brin. L'application majeure de ces puces est dédiée à l'analyse de du niveau de transcription des gènes. Les puces ADN ou « biopuces » ou encore DNA microarrays reposent sur le principe de la complémentarité des séquences d'ADN. Les séquences d'ADN simple brin déposées sur la lame de verre (appelées « sondes ») vont être en contact avec un ensemble d'ADN simple brin (appelés « cible ») extrait d'un individu. Une cible va s'hybrider spécifiquement avec la sonde qui lui est complémentaire. Ces cibles vont être marqués par des fluorochromes tels que les cyanines (rouge : Cy5 et vert : Cy3). L'hybridation de la cible sur sa sonde et l'excitation par des lasers des fluorochromes va permettre l'émission d'une lumière qui sera enregistrée et traduite en niveau d'expression du gène correspondant à la sonde.

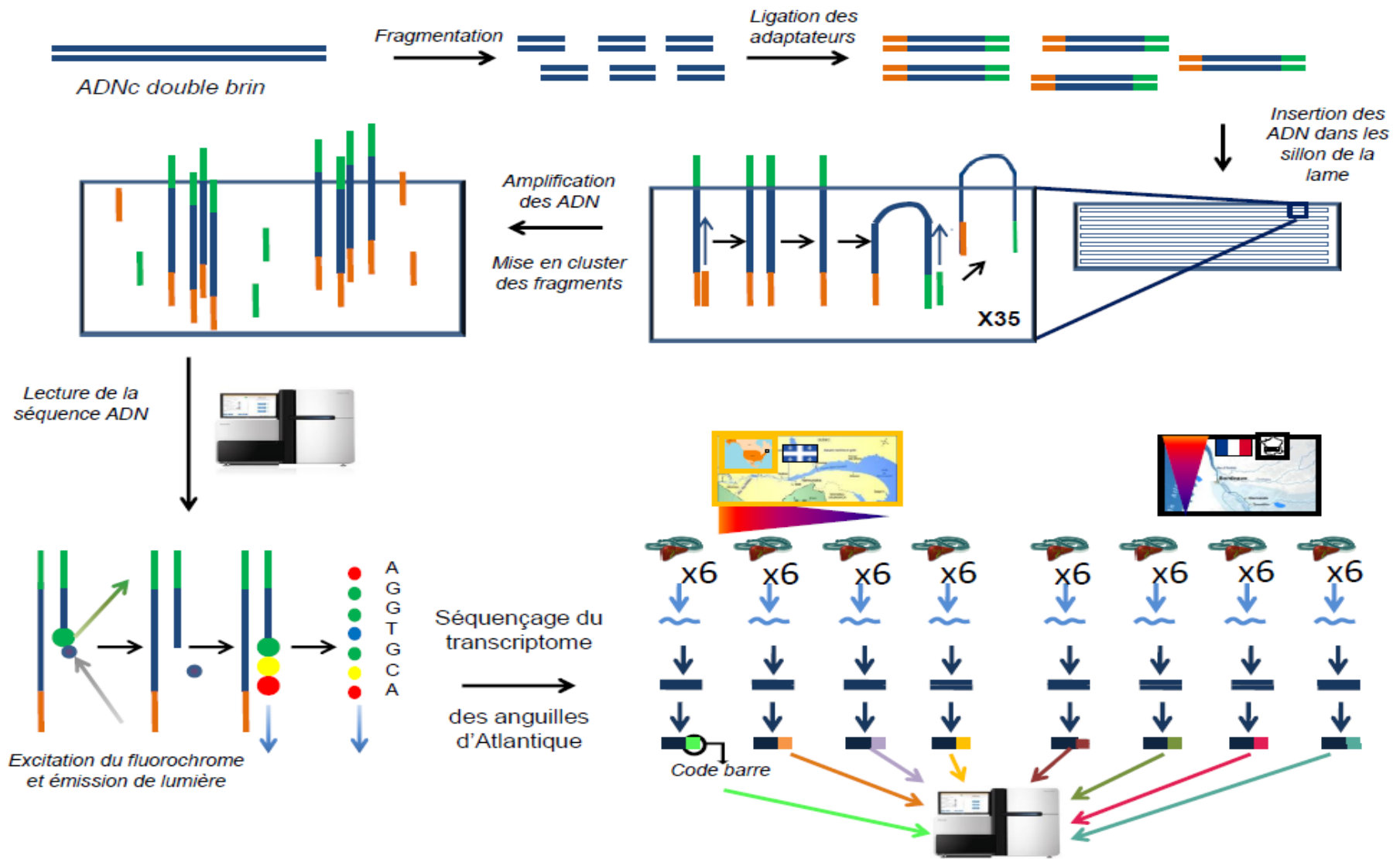


Figure 2.3 : Principe du séquençage par la méthode Illumina d'un fragment d'ADN et description de la démarche adoptée pour le séquençage du transcriptome des anguilles d'Atlantique.

Chaque sonde est présente en millier de copies sur une même zone (appelée « spot »), et la fluorescence émise à un spot donné sera proportionnelle au nombre d'hybridations formée à ce spot, en d'autres termes, au nombre de copies de la cible présentes initialement dans l'échantillon déposé sur la puce. L'utilisation de deux fluorochromes permet de déposer sur une même puce deux échantillons différents et les cibles de chaque échantillon vont entrer en compétition pour s'hybrider sur leur sonde correspondante. Ainsi si un spot, après excitation des fluorochromes, apparaît rouge, cela signifie que les cibles de l'échantillon marqué en rouge se seront hybridées en plus grand nombre comparativement aux cibles de l'échantillon marqué en vert. Cela suggère ainsi que pour ce gène, correspondant à cette sonde, ce dernier était plus exprimé dans l'échantillon marqué en rouge par rapport à l'échantillon marqué en vert. Si le spot apparaît jaune, cela signifie que pour ce gène donné, son expression est identique chez les deux échantillons testés. Les puces ADN permettent ainsi de détecter et de quantifier simultanément le niveau de transcription de plusieurs milliers de gènes chez un individu donné. Le nombre de gènes (sondes) présents sur la puce diffère selon les objectifs du projet. Pour exemple, sur les puces ADN utilisées dans le cadre médical, le nombre de gènes présents varie entre un millier à une dizaine de milliers de gènes (Lee et al., 2004). Plus récemment, les puces à ADN ont été utilisées en écotoxicologie pour étudier les impacts de contaminants sur l'expression des gènes. Ces dernières ont été d'abord établies chez des espèces modèles comme la daphnie (*Daphnia magna*) afin d'étudier les impacts de la toxicité de différents métaux tels que le cuivre ou le cadmium. Ces puces ont également permis la recherche de nouveaux biomarqueurs de toxicité (Poyton et al., 2007, Poyton et al., 2008 a, b).

Au cours de notre étude, nous avons sélectionné 1000 gènes, 1000 gènes de fonction biologique connue et dont le niveau de transcription était fortement corrélé à un facteur particulier, de nature anthropique ou naturel comme la température ou la salinité. La sélection de ces gènes appelés « gènes candidats » a été réalisée à partir d'une étude statistique sur le transcriptome des anguilles d'Amérique et d'Europe issu du séquençage décrit plus tôt dans ce chapitre. La stratégie adoptée a été d'établir un lien statistique entre le niveau de transcription de l'ensemble des gènes séquencés chez les 48 poissons et les niveaux de contaminations individuels en contaminants métalliques et organiques mesurés dans les différents organes de chacun des individus. Pour cela une collaboration avec un étudiant en doctorat en mathématiques appliquées, Raphaël Coudret a été initiée. Nous avons ainsi appliqué la méthode statistique FAMT (Factor analysis for multiple testing ; Friguet et al., 2009) au jeu de données (thèse Coudret R. 2013). De façon simplifiée, ce test réalisé sous R

(<http://www.r-project.org/>) en utilisant le package FAMT (Causeur et al., 2011) a permis d'établir des liens statistiques entre le niveau de transcription d'un gène et un facteur avec une p-valeur indiquant la force statistique du lien. Pour chaque facteur étudié, deux seuils ont été utilisés, le premier seuil permettait d'indiquer la p-valeur maximale acceptée du lien entre le facteur étudié et un gène, le second seuil indiquait la p-valeur maximale acceptée du lien entre tous les autres facteurs et ce gène. Par conséquent la p-valeur fixée pour le premier seuil était la plus faible possible et au contraire pour le second seuil, la p-valeur était la plus grande possible. Ainsi cela a permis d'obtenir un lien entre un gène et un facteur avec un lien statistique fort. Une valeur β était également donnée illustrant le sens du lien entre le gène et son facteur associé. Mon travail a consisté en premier lieu à sélectionner les facteurs à inclure dans le modèle FAMT puis à établir les listes de gènes associés aux différents facteurs testés.

3.1.3. Protocole des puces à ADN

Les sondes oligonucléotidiques des 1000 gènes choisis pour la puce ont été générées par informatique dans un premier temps. Il était en effet nécessaire de choisir une partie de la séquence du gène d'intérêt qui était la plus conservée entre les deux espèces. Une des propriétés importante d'une sonde est la température de fusion (T_m) qui correspond à la température à laquelle 50 % des brins sont associés avec la sonde. Les liaisons entre les bases nucléiques de chaque brin complémentaire peuvent être rompues par une élévation de température. Dans un souci de spécificité de la sonde pour un gène, il était alors primordial que la sonde ait un T_m élevé soit 60°C en moyenne pour l'ensemble des sondes. La longueur choisie était liée au T_m puisque celle-ci augmente avec le nombre de paires de bases et fut fixée à 60 mers (60 bases oligonucléotidiques). En outre une grande taille de sonde permettait de diminuer le risque d'une hybridation non spécifique entre deux molécules d'ADN simple brin relativement proches. En effet, plus la longueur de la séquence est longue, moins le risque d'une liaison non spécifique par similarité partielle de séquence peut arriver. Le logiciel ProDesign (Feng et Tillier, 2007) a été utilisé pour le choix des séquences les plus appropriées. Il permet notamment de prendre en compte la similarité éventuelle d'une séquence avec une autre présente dans le transcriptome. Une fois le « design » des sondes réalisé, ces dernières ont été synthétisées chimiquement par une entreprise de biotechnologie Eurofin Genomics en France. La construction de la puce à ADN c'est-à-dire la fixation (spotting) des sondes oligonucléotidiques sur les lames de verre a été réalisée à la plateforme Génomique et protéomique « Genotoul » de Toulouse (France). Sur chaque lame de verre,

deux puces ont été spottées. Chaque puce était composée des 1000 gènes déposés chacun en triplicat. Une fois la puce construite, chaque étape du protocole a été mise au point au laboratoire, de la préparation des ARNm à la lecture des lames au scanner.

3.1.3.1. Extraction des ARNm et préparation des ADNc

Pour chaque individu, les ARN totaux ont été extraits à partir de 20-25 mg de tissu (foie, nageoire ou gonade) à l'aide du kit d'extraction d'ARN « SV total RNA extraction kit » de PROMEGA modifié pour la puce à ADN. Le tissu a été inséré dans un tube contenant 450µl de tampon de lyse et 2 billes en métal puis passé à la broyeuse pendant 1 min à 30m/s. Après centrifugation pour éliminer de potentiels débris, le lysat fut récolté puis 400µL de phénolchloroforme ont été ajoutés pour séparer les composés hydrophiles (ARN et ADN) et hydrophobes (lipides). La phase supérieure (phase aqueuse) a ensuite été prélevée et placée dans un nouveau tube. Un ajout d'éthanol à 75% a été réalisé afin de rendre les ARN et ADN davantage négatifs (charge électrique) et donc d'optimiser leur fixation sur les colonnes d'affinités qui ont ensuite été utilisées pour isoler et purifier les ARNtotaux. Une fois le mélange éthanol-lysate déposé sur la colonne d'affinité, l'ensemble est centrifugé 1 min à 13000 rpm et le lysat qui a traversé la colonne est éliminé, le mélange ADN/ARN maintenant fixé sur la colonne. La colonne est ensuite nettoyée avec 600µl de tampon de lavage et à nouveau centrifugé pendant 1 min à 13000 rpm. La colonne est ensuite mise à incuber pendant 15 min à 37°C, en présence de DNase I (enzyme capable de dégrader l'ADN) pour ne récupérer ensuite que l'ARN. Après 2 lavages, l'ARN purifié a été récupéré par élution de la colonne avec de l'eau ultra-pure (50µl). La concentration en ARN a été mesurée par spectrophotométrie (Epoch microplate spectrophotometer, Biotek). La méthode de marquage au fluorochrome des ARNm a été réalisée par la méthode indirecte. En d'autres termes, l'étape du marquage débute au moment de la rétro-transcription (RT) des ARNm en ADN simple brin (ADNc) par l'incorporation d'une base nucléotidique modifiée. Cette base modifiée va permettre la fixation, dans un second temps après l'étape de la RT, des fluorochromes.

La retro-transcription des ARN totaux en ADNc a été réalisée avec 15 µg d'ARN totaux et auxquels ont été ajouté 3 µl (1µg/µl) de random primer, et 2 µl (1µg/µl) d'oligodT et de l'eau ultra-pure pour ajuster le volume à 20 µl. Après incubation 5 min à 70°C pour linéariser les ARN et les amorces, un mix de réactifs pour démarrer la réaction de RT a été ajouté (8 µL de

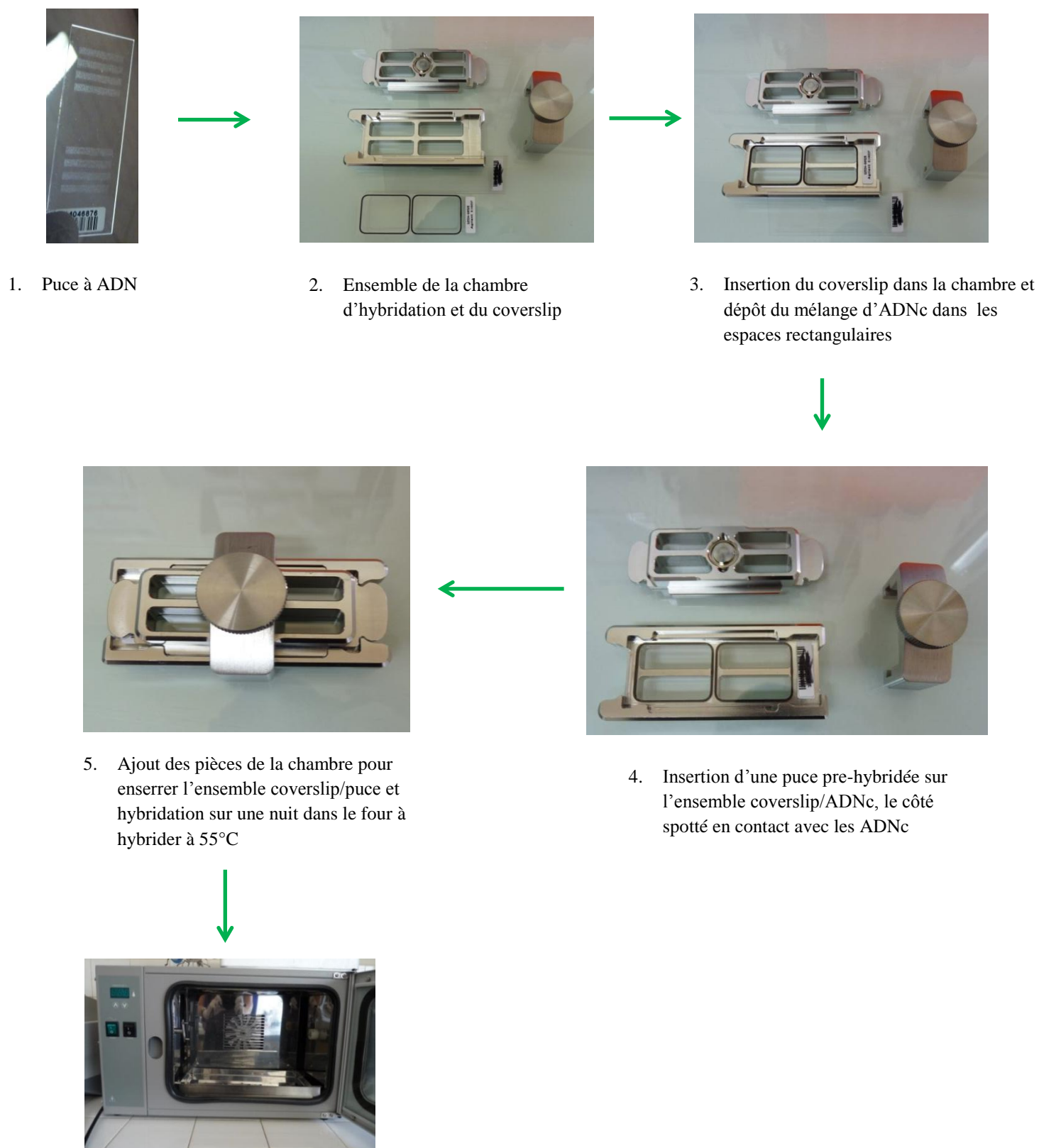


Figure 2.4 : Illustration des étapes d'hybridation des puces ADN.

tampon Goscript, 4 µL de DTT, 4,8 µL MgCl₂, 1 µL de dNTPmix 50x (sigma), 1 µL de dUTP (possède un groupement aminoallyle et remplace une partie des bases dTTP et permet a posteriori la fixation de fluorochrome sur la molécule d'ADNc) et 2 µL de l'enzyme Goscript RT). Le mélange a été ensuite soumis à deux températures différentes pour optimiser la réaction de transcription inverse ; 12 h à 20°C puis 3h à 42°C et 4°C en continu. Pour ne garder que l'ADN complémentaire, l'ARN a été ensuite hydrolysé par ajout de 4 µL d'EDTA à 0,2 M pH 8 et 6 µL de NaOH (1M) 10 min à 70°C puis un ajout de 6 µL d'HCl (1M) a été réalisé pour rééquilibrer le pH. Pour finir l'ADNc a été purifié sur des colonnes QIAGEN PCR purification kit selon le protocole recommandé par le fournisseur excepté pour l'étape d'élution des ADNc, où ces derniers ont été élués de la colonne avec du sodium bicarbonate à 0,1 M, pH 9 (60µl).

3.1.3.2. Marquage

L'ADNc a ensuite été marqué avec des fluorochromes. Ces fluorochromes étaient les cyanines 3 (Cy3) et cyanines 5 (Cy5) modifiées et possédant un groupement NHS-ester. Ce groupement réagit avec le groupement aminoallyle de la base dUTP ; ils sont alors incorporés dans l'ADNc. Chaque fluorochrome possède une longueur d'onde particulière, le Cy5 émet à une longueur d'onde de 635 nm et le Cy3 à 532 nm. Les Cy5 ont servi à marquer la référence, qui correspondait à un pool d'ADNc provenant du foie de 15 individus de Certes échantillonnés au printemps 2011 et de 15 individus de Certes échantillonnés au printemps 2012. Cette référence avait pour objectif de normaliser toutes les puces de façon identique et ainsi de pouvoir réaliser des comparaisons entre toutes les puces (méthode dite du « common reference design »). Le couplage des Cy5 avec l'ADNc (un mélange des ADNc avec un aliquot de Cy5 anhydre) a été réalisé en mélangeant la totalité de l'aliquot (60µl) d'ADNc (soit 1,5-2 µg d'ADNc) et 40 nmol de cy5 pendant 1h30, à température ambiante et à l'obscurité. Une solution d'hydroxylamine hydrochloride 4M est ensuite ajoutée au mélange (15 µl) puis incubé dans le noir pendant 15 min dans le but de stopper la réaction. Le mélange ADNc-Cy5 fut ensuite purifié sur colonne Qiagen selon le protocole du fournisseur. Après marquage, les échantillons ont été dosés au spectrophotomètre pour mesurer leur concentration en ADNc ainsi que leur FOI. Le FOI (fréquence d'incorporation) permet de calculer le taux de fluorochromes incorporé par molécule d'ADNc est basé sur le calcul suivant :

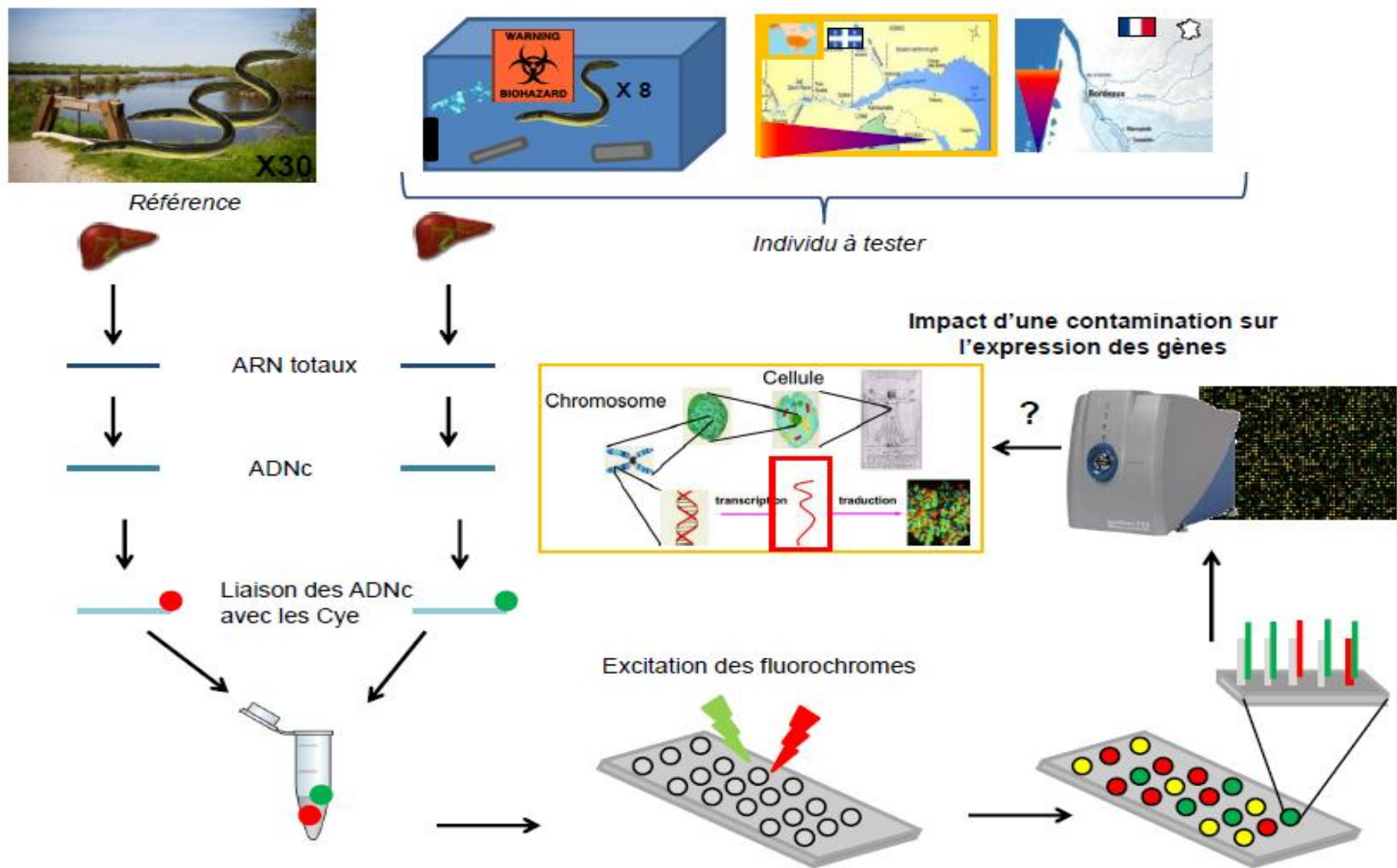


Figure 2.5 : Schéma illustrant les différentes étapes de la puce ADN appliquées au foie des anguilles exposées en laboratoire et de sites naturels de Saint-Laurent et de la Gironde.

$$\text{FOI} = \text{pmol Cye incorporé} / \text{Quantité totale d'ADNc}$$

$$= (\text{ACye} / \text{A260}) \times (324,5 / 37 \times \epsilon_{\text{cye}})$$

$$\text{Soit pour le Cy3 : FOI} = \text{ACy3} / \text{A260} \times 58,47$$

$$\text{Cy5: FOI} = \text{ACy5} / \text{A260} \times 35,08$$

Le FOI, mesuré au spectrophotomètre Epoch, devait être compris entre une valeur de 15 et 30, soulignant une bonne incorporation des fluorophores dans l'ADNc, soit un bon marquage. Le dosage de la quantité d'ADNc pour chaque échantillon est également effectué afin de prélever la quantité nécessaire pour l'étape d'hybridation sur les puces.

3.1.3.3. Dépôt sur la puce à ADN

Les lames ont été préalablement pré-hybridées avec un tampon de pré-hybridation (50 ml) contenant 0.1% (v/v) de BSA (bovine serum albumine) afin de saturer tous les sites de fixation non spécifiques et diminuer le bruit de fond sur les puces ainsi que du SSC (5X) et du SDS (0.1%). L'ensemble fut chauffé à 55°C pendant 1h puis les lames ont été transférées dans un tampon constitué de 0,1 X SSC et mis sous agitation pendant 5 minutes à température ambiante. Après renouvellement de cette étape, la lame fut transférée dans de l'eau ultra-pure et agitée 30 secondes puis séchée à la centrifugeuse à lame pendant 2 minutes. Une référence et un échantillon d'intérêt marqués ont été mélangés ensemble à une quantité égale (800 ng d'ADNc de chaque) et l'ensemble a été mélangé à un tampon d'hybridation composé d'ADN de thymus de veau (100µg/ml) dans le but de minimiser le bruit de fond, de 5X SSC (v/v) et de 0.1% SDS (v/v) puis déposés sur les puces à ADN. Un mélange échantillon-tampon de 240 µL (120 µl d'ADNc et 120 µl de tampon) au total fut déposé sur la lame et cette dernière a été insérée dans une chambre d'hybridation. L'assemblage de la lame dans la chambre d'hybridation est illustrée en figure 2.5.

L'étape d'hybridation a été réalisée sur une nuit à 55°C avec une rotation de 10 tours/min dans un four à hybridation (les étapes d'hybridation sont illustrées en figure 2.5). Le lendemain la lame a ensuite été lavée dans 3 tampons successifs de plus en plus astringents pour éliminer les hybridations non spécifiques (responsables d'un fort bruit de fond): tampon 1 (2X SSC ; 0,1%SDS), tampon 2 (0,1X SSC ; 0,1%SDS) et tampon 3 (0,1X SSC), puis elle a été lue dans un scanner pour puce à ADN (Innoscan 710, Innopsys).

Les données des puces ont été normalisées tout d'abord par le calcul du ratio (fluorescence/bruit de fond) pour la référence et l'échantillon. Si ce ratio était supérieur à 1,5, la valeur pour

le gène correspondant était sélectionnée pour la normalisation. La normalisation et les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel BRB-array Tools (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>) développé par Simon et al., 2007.

Les analyses de puce ADN ont été réalisées sur l'ensemble des conditions de laboratoire ainsi que sur les anguilles pêchées sur les 8 sites Québécois et Français avec 5 répliques par condition et site de pêche. Un schéma explicatif du fonctionnement des puces ADN dans le contexte de notre étude se trouve en figure 2.5.

3.2. Dosages des contaminants des expérimentations en laboratoire

Au cours de ces travaux de thèse, le dosage du Cd et du Hg dans les échantillons expérimentaux ou dans l'eau a été réalisé par spectrophotométrie d'absorption atomique. Le principe de cette mesure repose sur la loi de Beer-Lambert où les éléments à doser sont portés à l'état d'atomes libres sous forme de vapeur grâce à un atomiseur (source de chaleur). Les atomes à l'état fondamental vont alors absorber de façon spécifique le rayonnement émis par une source lumineuse. La mesure de l'absorption (intensité incidente/intensité transmise) est proportionnelle à la quantité d'atomes présents dans l'échantillon et permet de déterminer la concentration de l'élément (Cd ou Hg, dans notre cas) contenu dans l'échantillon par rapport à une gamme étalon.

3.2.1. Dosage du cadmium

Concernant le dosage du Cd, l'appareil utilisé était le M6 solaire (Thermo Elemental®) dont la limite de détection était de 0,1 µg/L pour cet élément. Pour cet appareil, un capillaire monté sur un passeur d'échantillon permettait de prélever l'échantillon à doser et de le déposer dans un four en graphite cylindrique de 2,5 cm de long où ce dernier subissait différentes phases de températures croissantes pour permettre la désolvatation (le séchage), la pyrolyse, la minéralisation (décomposition des molécules), l'atomisation de l'élément et enfin le nettoyage du four. Dans le but d'améliorer ces différentes étapes, des modificateurs de matrice ont été ajoutés aux échantillons. Parmi ces modificateurs de matrice, le palladium a été utilisé, qui en alliage avec le Cd, lui permet une meilleure stabilisation thermique et permettant ainsi une augmentation des températures pour éliminer plus efficacement les molécules qui pourraient absorber de manière non spécifique une partie du rayonnement émis. Le nitrate de magnésium a également été utilisé rendant certains éléments contenus dans

l'échantillon décomposables à de plus faibles températures, améliorant ainsi les étapes de pyrolyse et de minéralisation.

Pour le dosage des échantillons biologiques, c'est-à-dire le foie, les reins et les branchies, ces derniers ont été d'abord séchés à 45°C durant 3 jours à l'étuve et leur poids sec a été déterminé. Les échantillons une fois secs, sont mélangés à de l'acide nitrique (HNO_3) dans le but de les minéraliser (digestion) à 100°C durant 3h. Le volume en HNO_3 varie selon le poids de l'organe sec, soit 1 ml pour des tissus inférieurs à 50 mg, 2ml pour des tissus inférieurs à 100 mg et 3 ml pour des tissus supérieurs à 100 mg. Les éléments digérés sont ensuite dilués six fois avec de l'eau ultra-pure (MilliQ, Millipore®). Le volume en eau variant selon la quantité initiale d'acide nitrique. En effet, le dosage d'échantillons au M6 Solaar ne peut se faire que sous une forme liquide. Des échantillons témoins (ou « blanc ») sont ajoutés, correspondant à de l'eau ayant subi les mêmes étapes de digestion et dilution que les échantillons biologiques, ainsi que des échantillons certifiés (ayant subi les mêmes étapes de digestion et dilution). Ces échantillons certifiés sont au nombre de quatre, soit 2 TORT (hépatopancréas de homard) et 2 DOLT (foie de chien de mer) tous deux fournis par le NRCCC-CNRC (Conseil National de Recherches Canada) et permettent de contrôler la validité du dosage.

Concernant le suivi dans l'eau de la contamination en Cd dans les bacs expérimentaux, les étapes sont légèrement différentes concernant la préparation et le dosage en tant que tel, du fait que ces échantillons d'une part sont liquides, contiennent un pourcentage de sel élevé, l'eau des bacs étant saumâtre. La préparation des échantillons a consisté en l'ajout de 2% d'acide nitrique après chaque prélèvement dans les bacs afin de décomposer les couples Cd-Cl^+ et Cd-Cl_2 en Cd^{2+} et maintenir le Cd en solution. Le dosage de ces échantillons d'eau (préalablement dilués pour obtenir une salinité à 2‰) a consisté en l'ajout d'une troisième matrice en plus du palladium et du nitrate de magnésium, le nitrate d'ammonium (NH_4NO_3). En mélange avec l'échantillon, cette solution abaisse l'effet matrice du NaCl, en d'autres termes, a permis d'abaisser la température de volatilisation des espèces présentes dans l'échantillon d'eau saumâtre. Les blancs, comme les échantillons, ont été acidifiés avec de l'acide nitrique et dilués avec de l'eau de mer synthétique (préparée avec du sel de mer « instant océan® »).

3.2.2. Dosage du mercure

Concernant le dosage du Hg dans les individus de laboratoire, le muscle des anguilles a été utilisé. L'appareil utilisé était le AMA 254 (Leco®) qui lui dose exclusivement le mercure

total avec une limite de détection de $0,01 \text{ ng.g}^{-1}$. Contrairement au M6 solaire, ce dernier peut doser des échantillons tant liquides que solides. Afin d'éviter un biais avec le contenu en eau dans chaque échantillon, les échantillons ont été préalablement séchés pendant 48h à l'étuve à 45°C puis pesés afin de déterminer leur poids sec. Les valeurs de poids secs ont permis d'obtenir une concentration en μg de mercure total par gramme de poids sec de l'échantillon. Les échantillons de muscle, contenus dans des nacelles, sont introduits dans l'appareil à l'aide d'un passeur automatique. L'échantillon est ensuite chauffé à 200°C d'abord pour être séché puis à 600°C pour être décomposé sous un flux d'oxygène permanent. Tout comme le M6 solaire, les composants de l'échantillon, chauffé à 600°C , vont être atomisés et volatilisés. Le métal alors sous forme élémentaire et gazeuse (Hg^0) passe ensuite dans un tube catalytique permettant d'éliminer les composés volatiles halogénés pouvant perturber la mesure en Hg. Le métal est ensuite pré-concentré sur un piège d'or et libéré par chauffage de l'alliage Hg^0 -Or. Un flux d'oxygène va permettre de diriger le Hg gazeux vers les cellules de lecture où l'absorbance est déterminée à 253,65 nm.

3.2.3. Dosage des polychlorobiphényles et des pesticides organochlorés

Les dosages des PCBs et des pesticides organochlorés ont été réalisés par l'équipe de Toxico et Physico-Chimie de l'environnement (LPTC) du laboratoire EPOC à Talence (Gironde), dosages auxquels je n'ai pas participé et dont les protocoles sont décrits dans les articles du chapitre 4 et 5 et dans Tapie et al., 2008, 2011 et Labadie et al., 2010.

3.3. Dosages des contaminants des individus de terrain

L'ensemble des dosages des contaminants métalliques et organiques sur les individus de terrain sont décrits dans l'article du chapitre 3. Les dosages en métaux ont été réalisés dans le laboratoire de Patrice Couture au sein de l'INRS-ETE (Québec) et les dosages en contaminants organiques par l'équipe d'Hélène Budzinski au LPTC (France).

Chapitre 3

*Impact de la pollution et des facteurs naturels
sur le transcriptome de l'anguille
Américaine et Européenne
en milieu naturel par séquençage
haut débit (RNA-Seq)*

1. Introduction

En écotoxicologie, la démarche couramment utilisée pour étudier l'impact d'un contaminant en milieu naturel est de réaliser un échantillonnage d'individus dans un milieu contaminé et de comparer les réponses biologiques à des individus échantillonnés dans un milieu « propre ». Cependant, il reste difficile d'attribuer à la contamination l'ensemble des réponses mesurées chez ces individus. En effet, si les milieux comparés ne présentent pas les mêmes conditions physico-chimiques, l'interprétation des résultats obtenus peut devenir erronée si ces paramètres ne sont pas pris en compte. L'évaluation de l'impact des contaminants en milieu naturel reste donc encore une tâche difficile pour les écotoxicologues. L'utilisation des technologies dites « omiques » permettent aujourd'hui de développer une large approche sans *a priori* et pourrait permettre une meilleure compréhension du mode d'action d'un contaminant anthropique sur un individu. Ce type d'approche permettrait également d'identifier de nouveaux biomarqueurs d'exposition (Van Aggelen et al, 2010). Ainsi, ces technologies à large spectre pourraient s'avérer particulièrement pertinentes pour évaluer les impacts des activités anthropiques sur un système naturel. Le séquençage haut débit est un exemple d'outil qui, appliqué à la transcriptomique, permettrait de mieux répondre aux questions environnementales d'aujourd'hui, i.e., de détecter et démêler les effets des contaminants chez les organismes sauvages vivants dans un écosystème dynamique. L'établissement du niveau de transcription de l'ensemble des gènes chez des individus sauvages *via* le séquençage et son étude en regard des teneurs en polluants dans les organismes représenterait une grande opportunité de comprendre les effets de chaque contaminant dans de tels milieux complexes. A cela s'accompagne des défis bioinformatiques et statistiques où de simples analyses de corrélation ne permettraient pas de démêler les relations entre gènes et contaminants.

L'objectif de ce chapitre est ainsi de répondre à la question suivante : *Comment détecter et de démêler les effets propres de chaque contaminant chez des individus sauvages ?* En d'autres termes, peut-on trouver des marqueurs spécifiques à un contaminant ou un facteur naturel particulier ? Pour répondre à ces questions, un échantillonnage d'anguilles américaines (*Anguilla rostrata*) et européennes (*Anguilla anguilla*) a été réalisé le long de deux estuaires, le Saint-Laurent au Québec et la Gironde en France. Le séquençage haut débit du transcriptome du foie de ces animaux a été réalisé ainsi que le dosage des contaminants métalliques et organiques dans les tissus cibles. Une analyse FAMT a été ensuite réalisée en

confrontant le transcriptome des individus et la teneur de chaque individu en contaminants ainsi que certains paramètres morphométriques et physico-chimiques naturels de leur site d'échantillonnage respectif. La méthode FAMT est une méthode qui a été conçue pour sélectionner les gènes exprimés de manière différentielle dans les données de puce à ADN, soit pour des gros volumes de données (Friguet et al., 2009). En effet, cette méthode permet de réduire l'impact négatif de la dépendance liée à des corrélations multiples et de réduire ainsi le risque d'obtenir des faux positifs. Dans le cas présent, la méthode FAMT a été utilisée afin de réduire le risque de corréler un gène à une variable alors qu'il ne l'est pas et d'identifier et éliminer les gènes dont le niveau de transcription était corrélé à plusieurs facteurs.

Transcriptome profile analysis reveals specific signatures of pollutants in Atlantic eels

**Lucie Baillon · Fabien Pierron · Raphaël Coudret · Eric Normendeau ·
Antoine Caron · Laurent Peluhet · Pierre Labadie · Hélène Budzinski ·
Gilles Durrieu · Jérôme Sarraco · Pierre Elie · Patrice Couture ·
Magalie Baudrimont · Louis Bernatchez**

Accepted: 19 September 2014 / Published online: 26 September 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract Identifying specific effects of contaminants in a multi-stress field context remain a challenge in ecotoxicology. In this context, “omics” technologies, by allowing the simultaneous measurement of numerous biological endpoints, could help unravel the in situ toxicity of contaminants. In this study, wild Atlantic eels were sampled in 8 sites presenting a broad contamination gradient in France and Canada. The global hepatic transcriptome of animals was determined by RNA-Seq. In parallel, the contamination level of fish to 8 metals and 25 organic pollutants was

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:[10.1007/s10646-014-1356-x](https://doi.org/10.1007/s10646-014-1356-x)) contains supplementary material, which is available to authorized users.

L. Baillon · F. Pierron (✉) · L. Peluhet · P. Labadie ·
H. Budzinski · M. Baudrimont
Univ. Bordeaux, UMR EPOC CNRS 5805, 33400, Talence,
France
e-mail: f.pierron@epoc.u-bordeaux1.fr

R. Coudret · J. Sarraco
CQFD team, INRIA Bordeaux Sud-Ouest, Talence, France

E. Normendeau · L. Bernatchez
Département de biologie, Institut de Biologie Intégrative et des
Systèmes (IBIS), Université Laval, G1V 0A6, Quebec, QC,
Canada

A. Caron · P. Couture
Centre Eau Terre Environnement, Institut National de la
Recherche Scientifique, 490 de la Couronne, Quebec,
QC G1K 9A9, Canada

G. Durrieu
Université de Bretagne Sud, LMBA, UMR CNRS 6205,
56000, Vannes, France

P. Elie
IRSTEA, 50 avenue de Verdun-Gazinet, 33612 Cestas, France

determined. Factor analysis for multiple testing was used to identify genes that are most likely to be related to a single factor. Among the variables analyzed, arsenic (As), cadmium (Cd), lindane (γ -HCH) and the hepato-somatic index (HSI) were found to be the main factors affecting eel's transcriptome. Genes associated with As exposure were involved in the mechanisms that have been described during As vasculotoxicity in mammals. Genes correlated with Cd were involved in cell cycle and energy metabolism. For γ -HCH, genes were involved in lipolysis and cell growth. Genes associated with HSI were involved in protein, lipid and iron metabolisms. Our study proposes specific gene signatures of pollutants and their impacts in fish exposed to multi-stress conditions.

Keywords Transcriptome · Multi-pollutant · Wild fish populations · Atlantic eels

Introduction

Identifying and predicting the specific impacts of contaminants on wild organisms still remains a huge challenge. Indeed, aquatic ecosystems not only present a variety of man-induced stressors but also vary spatially and temporally due to variations in natural factors (Thrush et al. 2009). Moreover, in a multi-stress context, the effects of a given factor can be modulated or amplified in interaction with another, and organisms can be more vulnerable if additive or synergistic effects occur (Lapointe et al. 2011).

In this context, particular emphasis was placed in recent years on the potential use of “omics” technologies in ecotoxicology. By allowing a global approach, “omics” technologies have indeed the potential to discover new mechanisms of toxicity and to classify the

toxicity of contaminants. In molecular medicine, where these technologies (i.e. genomic, transcriptomic, epigenomic, proteomic or metabolomic) are already widely used, successful prospective and diagnostic cases studies were conducted with such approaches (Vlaanderen et al. 2010). In 2008, the fish toxicogenomics consortium thus proposed to use “omic” technologies in the aquatic risk assessment process (Van Aggelen et al. 2010). Among the “omics” technologies, the recent development of next generation sequencing (NGS) technologies and bioinformatic tools to analyze these large datasets offers the opportunity for ecotoxicologists to investigate the effects of contaminants on genome-wide evolution or on transcriptome-wide response in non-model but environmentally relevant species (Webster and Bury 2013; Regier et al. 2013). Gene expression profiling using RNA-seq (also called whole transcriptome shotgun sequencing) could play a key role to identify new biomarkers of exposure and adverse effects and to discover new toxicity pathways.

In the present study, we thus used RNA-seq technology on two threatened species, the European eel (*Anguilla anguilla*) and the American eel (*Anguilla rostrata*), to test whether changes in transcriptome profiles in wild fish may be used to detect and unravel the toxicity of pollutants in a context of in situ exposure. Atlantic eels are catadromous fish species with a complex life cycle including marine (spawning, larval phase and sexual maturation) and continental (feeding and somatic growth) environments. Historically abundant and widespread in Europe and North America, populations of Atlantic eels have suffered a sharp decline. European eel's recruitment is only one tenth of what it was in the early 1980s (Stone 2003; ICES report 2009). In Canada, and more precisely in one of the most important rivers of the North American continent, the St. Lawrence River, the situation appears to be equally worrying. Available data show a decrease in recruitment of around 40 to 80 % depending on the sites and years, some sites having registered a decrease of 98 % since early 1980s (de Lafontaine et al. 2010). In view of these data, the European species is currently considered as critically endangered (IUCN red list) and the American eel was recently designated as threatened species by the Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. As the unusual life cycle of Atlantic eels makes them particularly vulnerable to pollution, Atlantic eels are considered as sentinel species in ecotoxicology (Belpaire and Goemans 2007; Geeraerts and Belpaire 2010).

Thus, wild immature yellow eels (i.e. growth somatic phase) were sampled in 8 sites (4 Canadian and 4 French sites) presenting a contamination gradient and also a wide range of physicochemical conditions notably in term of

salinity and temperature. In France, European eels were sampled along a historically cadmium-contaminated hydrosystem, the Garonne–Gironde continuum (Durrieu et al. 2005). In addition, recent investigations have reported high concentrations of PCBs in the muscle of eels inhabiting the Gironde estuary (up to 3,399 ng g⁻¹ dw, Tapie et al. 2011). In Canada, fish were sampled along the St. Lawrence River. Past studies carried out on the muscle of American eels inhabiting this hydrosystem (Hodson et al. 1994) have reported high concentrations in PCBs (up to 0.83 µg g⁻¹ wet w), organochlorinated pesticides (up to 0.70 µg g⁻¹ wet w) and in mercury (up to 0.26 µg g⁻¹ wet w). The individual hepatic transcriptome of 6 replicate specimens of eel per sampling site was determined by high throughput RNA sequencing using Illumina Hiseq 2000 technology. In parallel, the contamination levels of fish in 25 organic pollutants and 8 metals were determined. Then, we carried out correlation analyses between the transcriptional level of a given gene and contaminant concentrations in each individual fish. Rather than perform comparisons among sampling sites, we combined fish from all sites before carrying out the statistical analyses. In addition, data from both European and American eels were combined before carrying our statistical analyses in order to (i) identify common genes and thus potential biomarkers of exposure that could be extrapolated across fish species and (ii) to work with the widest range of physico-chemical conditions and thus to remove as much as possible genes that are more likely to be affected by natural factors. Finally, condition indices such as the relative condition index (Kn), the hepatosomatic index (HSI) and the spleen somatic index (SSI) were added in the model in order to identify genes for which transcription levels could be associated to the general health status of animals.

Materials and methods

Wild eel sample collection

Eight sampling sites were selected in Quebec (Canada) and in France on the basis of their known gradient of contamination by metallic and organic pollutants (Lee et al. 1999; Durrieu et al. 2005). In Quebec, yellow eels (sexually undetermined fish) were collected in four sites (see Table 1) located near or in the St Lawrence Estuary (St Jean Lake: 48°51'40"N 64°28'47"O, Sud-Ouest River: 48°22'27"N 68°43'02"O, St Pierre Lake: 46°09'18"N 74°23'04"WO, St François Lake: 46°19'50"N, 74°23'04"WO). In France, immature yellow eels were collected in four sites along the Gironde aquatic system (Dordogne: 44°54'30.30"N 0°15'00.61"O, Garonne: 45°12'06.62"N 0°43'34.72"O and

Table 1 Morphometric measures (mean \pm SE, $n = 6$) and average concentrations of muscle organic pollutants (expressed as ng g^{-1} , dw) and kidneys metal concentrations (expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$, dw) in Atlantic eels sampled in 8 sites located in Canada and France

Groups of variables	Variables	Canadian sites (<i>Anguilla rostrata</i>)				French sites (<i>Anguilla anguilla</i>)			
		St Jean	Sud-Ouest	St François	St Pierre	Certes	Dordogne	Garonne	Gironde
Biometry	Length	529.26 \pm 22.43	347.53 \pm 18.47	827.93 \pm 14.12	890.87 \pm 10.53	434.53 \pm 19.2	338 \pm 12.78	442.66 \pm 17.73	578.66 \pm 15.02
	Weight	290.13 \pm 37.6	77.87 \pm 18.66	1,222.33 \pm 32.17	1,434.66 \pm 53.92	157.33 \pm 31.25	63 \pm 10.65	156.26 \pm 22.32	349.46 \pm 32.0
	SSI	0.27 \pm 0.07 ^a	0.22 \pm 0.05 ^a	0.09 \pm 0.01 ^{b,c}	0.09 \pm 0.01 ^b	0.11 \pm 0.01 ^{b,c}	0.09 \pm 0.01 ^{b,c}	0.12 \pm 0.01 ^c	0.06 \pm 0.004 ^d
	HSI	2.09 \pm 0.13 ^a	1.62 \pm 0.06 ^b	1.04 \pm 0.05 ^{c,d,e}	1.07 \pm 0.06 ^{c,d,e}	1.18 \pm 0.02 ^d	0.96 \pm 0.04 ^{e,f}	1.14 \pm 0.04 ^{d,e}	0.88 \pm 0.03 ^f
Natural factor	Kn	0.4 \pm 0.01 ^{a,c}	0.39 \pm 0.01 ^{a,c}	0.48 \pm 0.02 ^a	0.38 \pm 0.01 ^c	0.51 \pm 0.02 ^b	0.48 \pm 0.01 ^b	0.48 \pm 0.01 ^b	0.46 \pm 0.01 ^b
	Temperature (°C)	17.0	19.1	22.0	12.0	21.9	22.2	21.4	21.3
	Salinity (‰)	1.9	16.5	0.0	0.11	19.9	0.32	0.13	7.78
Contaminants									
	Metals								
	Cd	2.35 \pm 0.75 ^a	2.23 \pm 0.14 ^{a,c}	1.75 \pm 0.19 ^a	4.76 \pm 1.29 ^e	0.47 \pm 0.17 ^d	27.29 \pm 5.26 ^b	9.09 \pm 2.51 ^c	52.3 \pm 11.35 ^b
	Cu	6.01 \pm 0.67 ^a	9.3 \pm 1.04 ^b	5.94 \pm 0.39 ^c	8.78 \pm 1.16 ^b	7.18 \pm 0.80 ^{b,b,c}	6.54 \pm 0.35 ^{a,b,c}	6.06 \pm 0.98 ^{a,c}	8.7 \pm 0.65 ^b
	Zn	253.2 \pm 32.8 ^a	250.51 \pm 22.64 ^a	182.7 \pm 40.9 ^a	205.1 \pm 17.6 ^a	227.0 \pm 17.4 ^a	255.7 \pm 7.9 ^a	198.6 \pm 16.9 ^a	246.7 \pm 31.9 ^a
	Ag	0.08 \pm 0.01 ^a	0.39 \pm 0.14 ^a	0.09 \pm 0.02 ^a	0.63 \pm 0.41 ^a	0.01 \pm 0.001 ^a	0.09 \pm 0.03 ^a	0.13 \pm 0.05 ^a	3.38 \pm 1.48 ^b
	As	2.58 \pm 0.36 ^{a,c}	1.59 \pm 0.24 ^{c,d}	0.97 \pm 0.10 ^d	2.36 \pm 0.14 ^d	4.25 \pm 0.83 ^{a,b}	2.98 \pm 0.76 ^{a,c}	1.08 \pm 0.16 ^d	6.33 \pm 1.48 ^b
	Pb	0.19 \pm 0.06 ^{a,c}	0.12 \pm 0.02 ^{a,c}	0.09 \pm 0.02 ^c	0.36 \pm 0.16 ^a	0.25 \pm 0.03 ^a	0.73 \pm 0.16 ^d	2.7 \pm 1.54 ^{b,d}	2.68 \pm 0.62 ^b
	Cr	0.62 \pm 0.06 ^a	0.65 \pm 0.04 ^a	0.85 \pm 0.07 ^a	0.69 \pm 0.05 ^a	0.93 \pm 0.13 ^a	1.4 \pm 0.45 ^a	0.7 \pm 0.09 ^a	0.91 \pm 0.25 ^a
	Ni	0.66 \pm 0.08 ^{a,b}	0.55 \pm 0.07 ^{a,b}	0.26 \pm 0.03 ^c	0.47 \pm 0.15 ^{b,c}	0.97 \pm 0.33 ^{a,d}	0.56 \pm 0.17 ^{b,d}	0.46 \pm 0.08 ^{b,c}	0.88 \pm 0.17 ^{a,d}
	Hg	0.08 \pm 0.01 ^a	0.30 \pm 0.07 ^c	0.66 \pm 0.06 ^b	1.07 \pm 0.21 ^b	0.13 \pm 0.05 ^e	0.27 \pm 0.05 ^c	0.09 \pm 0.01 ^d	1.19 \pm 0.21 ^b
	PBDE 47	1.98 \pm 0.4 ^a	1.61 \pm 0.4 ^a	7.56 \pm 0.94 ^{c,e}	24.33 \pm 9.77 ^{b,c}	1.19 \pm 0.79 ^d	6.37 \pm 1.25 ^c	22.63 \pm 8.53 ^{b,c}	19.71 \pm 4.25 ^b
	Sum of all PCBs	33.44 \pm 3.86 ^a	28.41 \pm 3.42 ^a	142.11 \pm 15.79 ^c	164.25 \pm 33.19 ^c	77.48 \pm 12.54 ^d	325.65 \pm 56.25 ^c	1753.72 \pm 750.92 ^b	1477.69 \pm 309.64 ^b
	HCB	4.85 \pm 1.22 ^{a,d}	1.52 \pm 0.17 ^b	2.73 \pm 0.36 ^{a,c}	4.01 \pm 0.42 ^{a,d}	2.24 \pm 0.45 ^c	3.89 \pm 0.65 ^{c,d}	4.4 \pm 0.95 ^a	4.67 \pm 0.99 ^a
	γ HCH	0.19 \pm 0.02 ^a	0.13 \pm 0.02 ^a	0.15 \pm 0.01 ^a	0.12 \pm 0.01 ^a	0.84 \pm 0.17 ^b	5.57 \pm 1.39 ^c	4.01 \pm 1.07 ^c	0.98 \pm 0.17 ^b
	Trans-nonachlor	9.08 \pm 1.73 ^{a,c}	4.33 \pm 0.56 ^b	7.01 \pm 0.42 ^c	11.25 \pm 1.71 ^{a,c}	1.55 \pm 0.95 ^d	3.33 \pm 0.67 ^b	10.23 \pm 1.99 ^{a,c}	11.32 \pm 2.26 ^a
	2,4'DDE	2.30 \pm 0.34 ^{a,c}	1.90 \pm 0.28 ^{c,e}	3.49 \pm 0.37 ^{a,c,d}	4.44 \pm 0.71 ^{a,d}	1.33 \pm 0.56 ^c	2.35 \pm 0.59 ^e	10.88 \pm 3.27 ^b	4.54 \pm 0.95 ^{b,d}
	4,4'DDE + dieldrin	19.36 \pm 5.1 ^{a,c}	14.08 \pm 2.7 ^c	34.63 \pm 2.71 ^{a,b}	96.13 \pm 24.59 ^{b,e}	7.11 \pm 4.68 ^f	52.08 \pm 9.79 ^b	136.58 \pm 30.03 ^{d,e}	164.19 \pm 33.43 ^d
	4,4'DDD	2.48 \pm 0.57 ^a	1.32 \pm 0.12 ^a	6.48 \pm 0.43 ^b	14.23 \pm 5.26 ^b	1.96 \pm 0.64 ^a	10.09 \pm 1.8 ^b	43.46 \pm 10.27 ^c	50.87 \pm 10.82 ^c
	2,4'DDT	6.83 \pm 1.72 ^a	1.82 \pm 0.39 ^c	12.07 \pm 0.18 ^b	15.90 \pm 2.79 ^b	2.26 \pm 1.77 ^e	4.31 \pm 0.91 ^a	23.02 \pm 4.81 ^{b,d}	25.79 \pm 5.35 ^d
	Sum of DDT and metabolites	7.74 \pm 1.92 ^a	4.79 \pm 1.29 ^a	14.38 \pm 2.68 ^d	32.68 \pm 9.70 ^{b,d}	1.46 \pm 0.26 ^e	17.26 \pm 4.83 ^d	51.31 \pm 11.57 ^{b,c}	72.83 \pm 15.8 ^c
	Sum of all OCPs	44.91 \pm 9.79 ^{a,c}	25.00 \pm 3.29 ^c	66.42 \pm 3.2 ^{a,e}	145.97 \pm 31.54 ^{b,e}	16.45 \pm 8.99 ^f	76.07 \pm 13.57 ^{a,e}	228.60 \pm 47.15 ^{b,d}	261.40 \pm 52.46 ^d

For each country, the four sites are stored in a gradient of contamination. All data are expressed as mean \pm SE ($n = 6$ per site). Means designated with different letters are significantly different (LSD test, $p < 0.05$)

Gironde estuary: 45°12'06.62"N 0°43'34.72"O), and in the Arcachon Bay, considered as a pristine environment (Certes: 44°41'18"N 1°1'39"W). For all sites, temperature, salinity and dissolved oxygen concentrations were measured.

All fish were collected between May 24 and June 24 of 2011, using a trawl, a fyke net or by electrical fishing. All yellow eels were size selected to minimize potential allometric bias. The total length of American and European eels (672.8 ± 38.55 and 482.04 ± 31.01 mm, respectively; mean \pm SE, $n = 24$) and weight (811.42 ± 118.41 and 221.33 ± 34.06 g, respectively; mean \pm SE, $n = 24$) were recorded for each fish in order to estimate the relative condition factor [Kn: (total weight (g))/($0.0004 \times (\text{total length (cm)})^3.3828$) $\times 100$], the Hepato-Somatic Index [HSI: (weight liver/total weight) $\times 100$] and spleen condition index [SSI: (spleen weight/total weight) $\times 100$]. For each sampling region, a total of 6 fish were collected and used for subsequent analyses. Fish were dissected as soon as possible and organs were divided into several samples. Samples for gene transcription analyses were stored in RNA later at -20°C until needed. For both organic and metal analyses, samples were stored at -80°C .

Metal analyses

Metal analyses were determined from the kidneys, i.e. a main organ of metal bioaccumulation (Barbier et al. 2005). Kidney samples were freeze-dried in PFA vials (Saville) and kept in these vials during the whole digestion process. A 50 mg sub-sample was taken after the freeze-drying step to perform the mercury analysis. These sub-samples were processed in a mercury analyser (Milestone DMA-80) and MESS-3 certified reference material (National Research Council Canada) was used, with a recovery rate of $98.8 \pm 2.5\%$. The rests of the samples were digested overnight at room temperature in pure trace metal grade nitric acid (HNO_3). The following day, sample digestion was completed by autoclave (All American 25X-1) for 2 h at 15 PSI. Samples were then diluted in Milli-Q water to obtain a final concentration of 10 % HNO_3 . Metal concentrations for Ag, As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn were measured by inductively coupled plasma–mass spectrometry (ICP–MS; Thermo Scientific XSeries 2), inductively coupled plasma–atomic emission spectrometry (ICP–AES; Varian Vista AX) or both methods. Blanks and standards (TORT-2 and DOLT-4, National Research Council Canada) were submitted to the same digestion protocol as kidney samples to monitor the efficiency of the procedure. Recovery rates (expressed as % of certified values) were: Ag = $80.2 \pm 1.2\%$; As = $106.5 \pm 3.8\%$; Cd = $102.9 \pm 1.2\%$; Cr = $90.8 \pm 5.2\%$; Cu = $88.8 \pm 1.9\%$; Ni = $86.1 \pm 2.7\%$; Pb = $82.9 \pm 26.0\%$; Zn = $100.4 \pm 1.6\%$.

Organic pollutants analyses

Analysis of the seven indicator PCBs (CB50 + 28, CB52, CB101, CB118, CB138, CB153, and CB180), 14 OCPs (hexachlorobenzene or HCB, lindane or γ -HCH, dieldrin, heptachlor, heptachlorepoxyde, *cis*-chlordane, *trans*-nonachlor, mirex, and DDTs), and 4 PBDEs (BDE47, BDE99, BDE119, and BDE153) were performed on muscle samples (following the procedures described by Tapie et al. 2008 and Tapie et al. 2011). PCB, PBDE and OCP analyses were carried out on an HP 5890 series II gas chromatograph from Hewlett-Packard (Avondale, CA, USA) coupled to a ^{63}Ni electron capture detector (ECD). A capillary column HP5-MS (Agilent Technologies, Massy, France) was used ($30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$).

As described by Labadie et al. 2010, POPs levels were blank corrected and the method detection limit (LoD) was derived from the blank value variability. For PCBs LoQs were comprised between 0.2 and 2 ng/g dw; for OCPs they were comprised between 0.1 and 0.4 ng/g dw; for PBDEs they were comprised between 0.1 and 0.2 ng/g dw.

Preparation of cDNA libraries and contig assembly

For the transcriptomic sequencing, the liver was selected due to its wide range of functions, including detoxification and energy metabolism. For each sampling site (Quebec and France), six biological replicates were used ($n = 48$ eels). Briefly, total RNAs were individually extracted from fish liver using the PureLinkTM RNA mini kit (Invitrogen). During this step, samples were submitted to DNaseI treatment, according to the manufacturer's instructions. Then, preparation of cDNA libraries for Illumina HiSeq 2000 sequencing was done using the TruseqTM Stranded mRNA sample prep kit, following the manufacturer's instructions. The 48 individually tagged libraries were randomly pooled in equal amounts and sequenced on 4 lanes at the Genome Quebec innovation Center (McGill University, Montreal, QC, Canada) using Illumina HiSeq 2,000 technology (100 bp paired-ends reads).

Base calling was performed using PyroBayes (Quinlan et al. 2008) after trimming adapters. Each read was then renamed according to its individual barcode. This barcode and the potential primers used for cDNA amplification were subsequently removed. To construct the transcriptome, a consensus sequence of one step was used to perform the next. Therefore any sequencing errors have been ignored because they have not been included in the consensus sequence. Then the CLC Genomic Workbench 4.9 software was used to align the reads back against the assembled transcriptome. A similarity of 0.98 and a length fraction of 0.6 were used while leaving the other parameters to their default values. The consensus sequence of each

de novo built contig was then used as a template for a reference assembly under the same parameters. This second round of assembly aimed at screening for additional reads that were not included into contigs during the step of *de novo* assemblies and excluding poor-quality contigs that did not recruit any read during the reference assembly procedure. To annotate these contigs based on similarity with known proteins, they were blasted on both the swissprot and nr protein databases using BLAST program. Gene transcription was normalized by using RPKM (Mortazavi et al. 2008) (Reads Per Kilobase per Million mapped reads) before statistical analyses.

Real-time quantitative RT-PCR (RT-qPCR) validation

Eight genes that showed strong variations in their transcription levels among sampling sites were quantified by RT-qPCR on the same liver samples used for RNA-seq. For each gene, specific primer pairs were determined (see supplementary material Table S1) using the lightcycler probe design software (Roche). RNAs were extracted from 30 mg of tissue using the SV total RNA isolation system (Promega) according to the manufacturer's instruction. One μg of total RNAs was used for cDNA synthesis using Goscript reverse transcriptase (Promega), oligodT primer and random primers according to manufacturer's instructions. Resulting cDNAs were diluted 2-fold for PCR reactions. RT-qPCR reactions of 20 μl were performed in a Stratagene *Mx 3,000p* system using Brilliant III Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene-Agilent) and 1 μl of diluted cDNAs. The reaction specificity was determined for each reaction from the dissociation curve of the PCR product and electrophoresis. Data analysis was performed using the β -actin gene as reference. Hence, during our experiment, total RNAs were quantified and 1 μg was used to be reverse-transcribed. During the subsequent qPCR amplifications, the output cycle corresponding to the β -actin was examined. This output cycle did not show significant differences among fish, demonstrating the relevance of the β -actin as reference gene in our conditions.

Statistical analyses

Concerning contaminant analyses, comparisons between fish groups were performed by analysis of variance (ANOVA), after checking assumptions of normality and homoscedasticity of the error terms. The Least Square Deviation test (LSD) was used to determine whether means between pairs of samples were significantly different from one another. Computations were performed using the statistical software Sigma Stat.

Due to the wide distribution area of eels and since factors unique to each site but unrelated to metal or organic

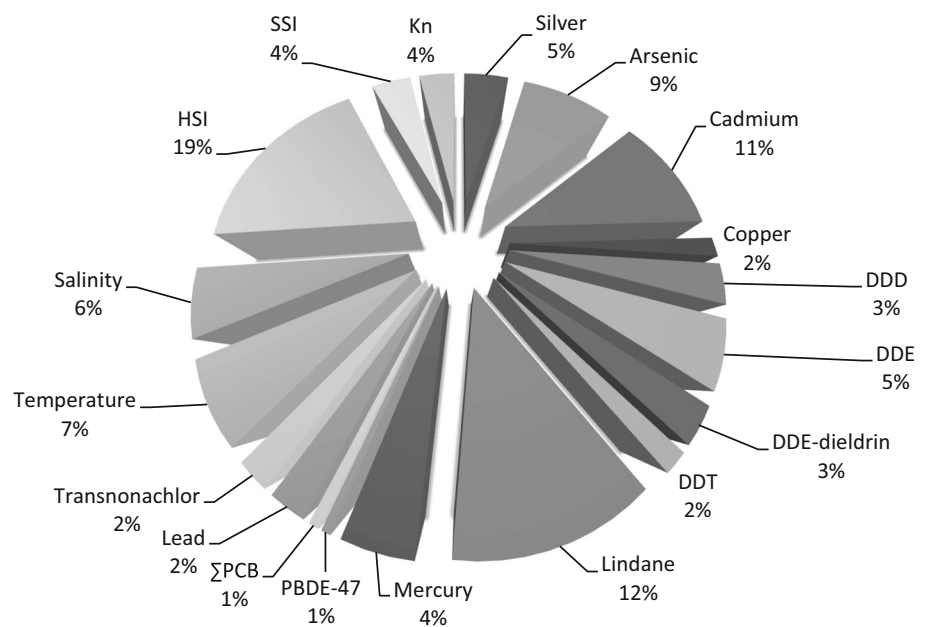
contamination (e.g. temperature, salinity,...), can also affect the gene transcription level, the FAMT approach was adopted to increase statistical power between a variation in the transcription level of an individual gene and the contamination level of fish for a given contaminant. Thus, in addition to contaminants, natural factors that showed significant variations among sites (mainly temperature and salinity) as well as some morphometric measurements (length and weight) were added to the model in order to remove, at least in part, genes for which transcription levels could be more likely related to these factors rather than with contaminants. Then, the variables such as pollutant concentrations, condition indices (i.e. the relative condition index (Kn), the hepato-somatic index (HSI) and the spleen somatic index (SSI)) or physicochemical conditions of sampling sites (i.e. temperature and salinity) were gathered in a matrix made of independent observations from a standard normal distribution. This model has been studied in Friguet et al. (2009) and modified for our transcriptomic data (for more information see Coudret 2013). By using this test, we also controlled the False Discovery Rate (FDR) over the set of contigs for a given variable. The R package FAMT (Causeur 2011) allowed us to produce a *p value* between a factor and contigs. For every studied variables, we then introduced two thresholds $\delta_{i,1}$ and $\delta_{i,2}$ and we selected a contig according to the two thresholds. In this way, the *pvalue* calculated between a given variable and one contig had to satisfy the thresholds $\delta_{i,1}$ and *p value* calculated between another variable for the same contig had to satisfy the thresholds $\delta_{i,2}$. For each contig and each variable, the β represents the correlation length (see supplementary material for more details).

Results and discussion

Condition and contamination levels of eels

Morphometric measurements, conditions indices and contamination levels of all eels and their difference among sampling sites are presented in Table 1. Generally, the highest levels of contamination in both metallic and organic contaminants were observed in eels from France. Significant increases in pollutant concentrations were observed along the French gradient from Certes \rightarrow Dordogne \rightarrow Garonne \rightarrow Gironde. To a lesser extent, we observed a contamination gradient from St. Jean \rightarrow Sud-Ouest \rightarrow St. François \rightarrow St. Pierre for Quebec. Concerning metals, the highest variations were observed for cadmium (Cd) and silver (Ag). For Cd, animals inhabiting the Gironde estuary were 112-fold more contaminated than eels from Certes, i.e. the cleanest site in France, and 11-fold superior to Lake St. Pierre, i.e. the

Fig. 1 Results of FAMT analyses with low stringency: Percentage representation of genes correlated with a single factor



most contaminated site in Quebec. For Ag, eels from Gironde were 338-fold superior to eels from Certes with low concentrations of 3.4 ± 1.5 and $0.01 \pm 0.001 \text{ ng g}^{-1}$ respectively. Concerning organic pollutants, the highest variations were observed for metabolites of DDT and PCBs. For Gironde, eels were 56 and 2.3-fold more contaminated than eels from Certes and St Pierre Lake, respectively. For PCBs, eels from Gironde were 24-fold more contaminated than eels from Certes and 10.6-fold more contaminated than eels from St Pierre Lake. These high contamination pressures in Gironde were associated with a poor health status of eels. Eels from Gironde presented the lowest values for Kn, HSI and SSI in comparison to eels from the other French sites.

RNA-seq data

RNA-seq generated 2.7 billion fragments averaging 75 bases in length. The assembly of these reads generated a total of 54,140 contigs, 95 % of the contigs were longer than 200 bp and 11.7 % were longer than 1,000 bp. A total of 18,115 contigs showed high homology with known sequences (BLASTX, $E\text{-value} \leq 10^{-10}$). A total of 11,547 unique genes of known function were identified (i.e. multiple contigs that had the same annotation were removed).

To validate the sequencing data, the transcriptional level of 8 genes that showed strong variations in their transcription levels among sampling sites was measured by RT-qPCR method. These two independent measures, by RNA-seq and RT-qPCR, of transcript abundance gave consistent results, i.e. transcription data obtained by these

two methods were significantly correlated ($p < 0.0001$ for all of genes tested; see supplementary material table S2).

Quantitative influence of factors on eel's transcriptome

In order to get an overview of the effects of natural and anthropogenic factors on the transcriptome profiles of eels, we first used the FAMT method with low stringency thresholds: $\delta_{i,1} = 0.009$ and $\delta_{i,2} = 0$. From the 11,547 unique genes, the transcription level of 1,523 single genes of known function was significantly correlated with pollutants or natural factors. We then counted how many contigs were linearly linked with each of the $n = 19$ variables (Fig. 1 and Table S3). For biometric variables, 284 genes were identified for HSI, 60 for SSI, and 55 for Kn. This corresponds to 19, 4, and 4 % of the total number of genes, respectively. The dominant percentage of genes associated to HSI appears to be consistent with the fact that transcriptome analyses were carried out on the liver tissue.

Among metals, the number of genes reached 140 (9 %) for As, 164 (11 %) for Cd and 4 % for Hg and 5 % for Ag. Despite that the highest contamination gradient was observed for Ag, Cd and As seemed to have more influence on the transcriptome of eels. For POPs, γ -HCH (lindane) was associated with the greatest number of genes ($n = 182$, 12 %), followed by DDT and its metabolites 4,4'DDD, 2,4'DDE, 4,4'DDE + dieldrin represented around 2 and 5 % of total genes (Fig. 1). Interestingly, despite the fact that we observed very high concentrations of PCBs in eel muscle, few genes were associated with this

contaminant. In contrary, numerous genes were associated with lindane whereas it was found weakly accumulated in eels. Temperature and salinity were respectively linked with 6 and 5 % of genes. Since they are essential factors controlling the food intake and growth rates in fish, it is quite surprisingly that these two factors were less represented than pollutants. This could suggest that contaminants have more influence on the liver transcriptome of eels than temperature, which could be related to the fact that the liver is a major target of pollutant metabolism, accumulation and toxicity.

Genes associated with several factors

The aim of the present study was to unravel the effects engendered by anthropogenic or natural factor in wild organisms. However, it was also interesting to study genes that were associated with several factors. They could indeed represent genes that are involved in a more general stress response and that could be used to assess the general health status of animals. Among genes highlighted by the FAMT analysis, 57 were significantly associated with four or more factors (Table S3). Surprisingly, no genes that are known to respond to oxidative stress or metal toxicity, such as metallothionein or heat shock proteins, were found among the 57 genes. However, a significant correlation was observed for the *metalloreductase STEAP4* gene. This gene encodes for a protein located in the Golgi apparatus and that is involved in Fe^{3+} and Cu^{2+} reduction. This gene was negatively associated with Hg, Cd, As and Ag. Moreover, three genes encoding for zinc finger proteins (*zinc finger and BTB domain-containing protein 12*, *zinc finger protein ZPR1*, *zinc finger MYM-type protein 2*) showed significant correlations with salinity, temperature, As, Cd or lindane. Zinc finger proteins are known to be important targets of metals like Cd, Ni or Co. Interactions of these proteins with metals can induce change in either their structure or function (Hartwig 2001). Thus, our results suggest a potential effect of As, Cd and lindane on these proteins. This could lead to disorders in gene transcription, cell growth or DNA repair (Hartwig 2001). Moreover, in the present results, numerous genes involved in gene transcription regulation and RNA processing such as the *histone-lysine N-methyltransferase SETD1B-A*, *mediator of RNA polymerase II transcription subunit 6* gene, *ribosomal RNA methyltransferase NOP2* and *ribosomal RNA small subunit methyltransferase NEP1* genes showed significant correlations not only with some metals and organic compounds but also with salinity and/or temperature. The fact that some metals or organic pollutants can induce changes in the transcription level of genes that are also regulated by natural factors such as temperature or salinity suggest that

chronic exposure to pollutants could impair the adaptive response developed by fish to curb with variations in natural factors (Lapointe et al., 2011).

Genes associated with arsenic, cadmium, lindane and HSI

As HSI, As, Cd and γ -HCH were linked with the greatest number of contigs in their respective group (i.e. condition indices, metal and organic pollutants), we then focused our investigations on these variables. To do this, we re-analyzed our data by the FAMT method but by using more restrictive thresholds (see Table 2 and Table S4 for more details). The aim of this approach was to identify genes that are most likely to be related to a single variable.

Hepato-somatic index

The hepato-somatic index (HSI) is a useful and robust index commonly used to estimate the energy status of fish (Chellappa et al. 1995). This parameter was incorporated in our FAMT model in order to identify genes that could represent biomarkers of the general health status of fish.

The transcription level of 14 genes (Table 2) showed significant correlations with the HSI of fish. Among these genes, 4 genes encode for ribosomal proteins, i.e. *60S ribosomal protein L5 (rpl5)*, *40S ribosomal protein S29 (rps29)*, *60S ribosomal protein L23 (rpl23)* and *ubiquitin-60S ribosomal protein L40 (uba52)*. Interestingly, the transcription level of these genes was found to increase or decrease with increasing fish HSI. This could be linked, at least in part, to the fact that these genes are not only involved in protein translation but also in cell cycle by regulating the accumulation of the p53 protein in cell (Horn and Vousden 2008; Lee et al. 2012). The p53 protein is involved in cell cycle arrest and apoptosis. In this view, it is interesting to note that increasing fish HSI were significantly correlated with a drastic and similar decrease in *rpl5* ($\beta = -2.82$) and *glioma tumor suppressor candidate region gene 2 protein (gltscr2)*, $\beta = -2.10$) transcription levels. Both *gltscr2* and *rpl5* genes are involved in the ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway. Its activation is known to induce p53 stabilization. Moreover, recent discoveries tend to show that this pathway could play a pivotal role in cellular energy homeostasis, the ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway serving as a molecular metabolizing switch to direct nutrient utilization in an effort to promote cell survival (Deisenroth and Zhang 2011). Our results could suggest an important role of ribosomal proteins as well as the ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway in liver development and hepatic accumulation of energy reserves. Another potential marker of cell division and hepatic growth is the gene encoding for *thioredoxin (txn)*. The

Table 2 Results of FAMT analysis for the most significant correlations ($\delta_{i,1} = 0.005$ and $\delta_{i,2} = 0.1$) established between gene transcription levels and concentrations in eels in As or Cd or lindane or with fish HSI

Factor	<i>p</i>	β	Gene name	Biological process
Arsenic	0.002	−0.12	Zinc finger protein 36, C3H1 type-like 1	(1) mRNA metabolic process (2) Vasculogenesis
	0.004	0.06	E3 ubiquitin-protein ligase RNF115	Ubiquitin conjugation pathway
	0.004	−0.05	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 5	Ion transport
	0.004	−0.05	Metalloprotease TIKI2	Wnt signalling pathway
	0.002	−0.09	Trehalase	Trehalose catabolic process
	0.004	−0.005	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	(1) 3'-UTR-mediated mRNA stabilization (2) inflammatory response
	0.001	0.1	15 kDa selenoprotein	Protein folding
	0.002	−0.21	Zinc transporter ZIP11	(1) Ion transport (2) zinc influx
	0.002	−0.21	25-hydroxyvitamin D-1 alpha hydroxylase, Mitochondrial	Vitamin D metabolic process
Cadmium	1.27e-05	−0.007	Pericentriolar material 1 protein	Centrosome organization
	0.0002	−0.003	Utrophin	Positive regulation of cell–matrix adhesion
	0.0002	−0.004	E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	Protein polyubiquitination
	0.0003	0.03	Activin receptor type-2A	Positive regulation of activin receptor signaling pathway
	0.0005	0.02	Transcription factor E2-alpha	Cell differentiation
	0.0005	−0.007	Protein 4.1	Cytoskeleton organization
	0.001	0.003	Band 4.1-like protein 3	Apoptosis
	0.001	0.01	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 20	Ubiquitin-dependent protein catabolic process
	0.001	0.01	C-terminal-binding protein 2	(1) Transcription corepressor activity
	0.001	−0.008	Acetylcholinesterase collagenic tail peptide	Neurotransmitter degradation
Lindane	0.004	0.002	Sortilin-related receptor	(1) Cholesterol metabolism (2) Lipid metabolism and transport (3) Steroid metabolism
	0.0001	−0.13	Zinc finger protein 148	(1) Regulation of apoptotic process (2) Regulation of cellular amino acid metabolic process
	0.0003	0.04	Oxysterol-binding protein 2	(1) Lipid transport
	5.53e-06	0.1	Mitochondrial coenzyme A transporter SLC25A42	ADP transmembrane transporter activity
	0.0005	0.14	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial	Fatty acid metabolism
	0.002	0.06	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 13	Mediator complex
	5.31e-06	−0.03	Myelin protein zero-like protein 2	Cell adhesion
	3.15e-05	0.06	Peroxisomal membrane protein PEX13	Fatty acid alpha-oxidation
	0.0004	0.09	Serine protease hepsin	(1) Serine-type endopeptidase activity (2) Positive regulation of hepatocyte proliferation
	0.002	0.12	Decorin	Organ morphogenesis
	0.002	0.06	RNA-binding protein 4B	mRNA processing

Table 2 continued

Factor	<i>p</i>	β	Gene name	Biological process
HSI	0.004	−2.10	Glioma tumor suppressor candidate region gene 2 protein	/
	0.003	−2.82	60S ribosomal protein L5	Translation
	0.003	0.51	40S ribosomal protein S29	Translation
	1.29e-06	1.93	Putative ferric-chelate reductase 1	Electron transport chain
	0.005	0.86	Cathepsin B	Proteolysis
	0.004	0.98	60S ribosomal protein L23	Translation
	0.002	−0.93	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	(1) Translation (2) DNA repair (3) G1/S transition of mitotic cell cycle
	0.004	−0.96	Ethanolaminephosphotransferase 1	Phospholipid biosynthesis
	0.002	0.63	Hephaestin-like protein 1	Iron homeostasis
	0.0009	0.13	Transmembrane channel-like protein 7	Ion transport
	0.003	1.01	UDP- <i>N</i> -acetylglucosamine-dolichyl-phosphate <i>N</i> -acetylglucosaminephosphotransferase	Protein glycosylation
	0.001	1.54	Thioredoxin	(1) Cell redox homeostasis (2) Cell proliferation
	0.0005	1.08	Proteasome activator complex subunit 2	Proteasome activator complex
	0.004	−0.10	Acyl-CoA-binding protein	Triglyceride metabolic process

transcription level of *txn* was positively associated with fish HSI ($\beta = 1.54$). The TXN protein is known to play an important role in cell viability by inducing cell proliferation and increasing cell lifetime (Yoshida 2005). The transcription levels of 2 other genes involved in protein metabolism were found to be positively correlated with fish HSI. These genes, i.e. *proteasome activator complex subunit 2* (*psme2*) and *cathepsin B* (*ctsb*), encode proteins that are responsible for proteolysis (Min et al. 2013; Mohamed and Sloane 2006). Cathepsin B is known to play a key role in protein turnover (Mohamed and Sloane 2006).

In addition to genes involved in protein metabolism and cell division, significant correlations were observed with genes that encode proteins involved in lipid and iron metabolism. The two genes involved in lipid metabolism, i.e. *Acyl-CoA-binding protein* (*acbp*) and *Ethanolaminephosphotransferase 1* (*ept1*), were negatively correlated with fish HSI ($\beta = -0.10$ and $\beta = -0.96$, respectively). The EPT1 protein catalyzes the biosynthesis of phosphatidylethanolamine (PE), i.e. a major phospholipid (Gibellini and Smith 2010). It is somewhat surprising that an increase in fish HSI was associated with a decrease in *ept1* transcription level. This could be linked to the fact that PE is the precursor of many biologically active molecules such as pro-apoptotic substances (Gibellini and Smith 2010). The ACBP protein has been shown to act as intracellular acyl-CoA pool former, transporter and regulator of gene transcription (Oikari et al. 2008). In a recent study,

overexpression of *acbp* in transgenic rats was found to trigger a down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ and sterol regulatory element-binding protein-1 gene transcription levels, i.e. metabolic regulators involved in lipogenesis and lipid synthesis (Oikari et al. 2008). Thus, a decrease in *acbp* transcription level could indicate lipid storage. Finally, an increase in fish HSI was associated with an up-regulation of genes involved in both iron secretion and influx, i.e. *hephaestin-like protein 1* (*hephl1*) and *putative ferric-chelate reductase 1* (*frs1*), respectively. Such results appear consistent with the fact that iron plays a key role in cellular respiration and energy metabolism. This is also consistent with the fact that fish liver plays a central role in iron metabolism and hemoglobin turn-over (Graham and Chua 2007).

In summary, our results showed that an increase in fish HSI is associated with changes in the transcription level of genes involved in several biological pathways including cell division, protein turnover, lipid metabolism and iron transport.

Arsenic

The FAMT method with highly restrictive thresholds allowed us to identify 9 genes for which transcription levels were significantly correlated with the As content of eels. The majority of these genes, i.e. 7 genes (Table 2), were found to be down-regulated and 2 genes were up-

regulated. These 2 up-regulated genes, i.e. *E3 ubiquitin-protein ligase RNF115* (*Rnf115*) and *15 kDA selenoprotein* (*sep15*), are involved in protein metabolism. RNF115 is an ubiquitin-protein involved in the ubiquitination pathway and proteolysis (Burger et al. 2006). SEP15 is involved in the quality control of protein folding and in the endoplasmic reticulum stress response (Labunskyy et al. 2007). Such a pattern could be linked to the fact that As is well known to interfere with protein folding, leading to accumulation of protein aggregates in cell (Martín-Pardillos et al. 2013). The up-regulation of these genes could aim to limit the accumulation of unfolded proteins in cell in response to As exposure. Interestingly, among the down-regulated genes, numerous genes are involved in biological functions that are known to be involved in the vasculotoxicity of As in mammals. The various mechanisms that have been observed during As vasculotoxicity include endoplasmic reticulum stress (as described above), apoptosis, oxidative stress, inflammatory mediators and vascular smooth muscle cells (VSMC) calcification (Martín-Pardillos et al. 2013). Thus, a down-regulation of the *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0* (*HNRPA0*) gene that encodes a protein involved in the inflammatory response by controlling cytokine synthesis was observed in As-contaminated fish. The *zinc finger protein 36* (*zfp3611*) that is known to be involved in vasculogenesis (Bell et al. 2006) was also found to be down-regulated. The *metalloprotease TIKI2* (*trabd2*) gene was down-regulated in eels exposed to As. *Trabd2* encodes for a protein that antagonizes the Wnt signaling pathway (Clevers and Nusse 2012). Recent works have shown that Wnt signaling pathway activation can trigger calcification of VSMCs (Martínez-Moreno et al. 2012). We also observed a decrease of *threhalase* gene transcription level. This gene encodes for an enzyme that hydrolyses trehalose. Trehalose is a disaccharide known to protect membranes in case of extreme environmental conditions (Higashiyama 2002). Moreover, in osteoporosis mice model, trehalose has been shown to decrease the development of osteoporosis (Higashiyama 2002). In the same way, it is interesting to note that we observed a strong effect of As on the transcription of *25-hydroxyvitamin D-1 alpha hydroxylase* gene (*cyp27b1*). This gene encodes an enzyme that synthesizes the active form of vitamin D₃ (Rowling et al. 2007). Vitamin D₃ under its active form acts as a hormone that controls growth and bone remodeling. In this context, we must note that VSMCs calcification during As exposure in rats was found to be accelerated by intraperitoneal injection of vitamin D₃ (Martín-Pardillos et al. 2013). We could thus hypothesize that the down-regulation of *cyp27b1* could aim to protect the hepatic vasculature system against calcification. Two last genes involved in ion transport were found down-regulated in response to As exposure, the *zinc transporter*

ZIP11 (*slc39a11*) and *transient receptor potential cation channel subfamily M member 5* (*trpm5*), suggesting an effect of As on cellular homeostasis. To conclude, it is interesting to pinpoint that many mechanisms that have been reported in mammals during As vasculotoxicity are affected in fish chronically exposed to As, thus suggesting that the hepatic vascular system could be a main target of As toxicity in wild fish.

Cadmium

Among genes that showed significant correlations with Cd concentrations in fish, 5 genes were found to be down-regulated and 6 were found to be up-regulated.

Among down-regulated genes (Table 2), two genes involved in acetylcholine metabolism were identified. First, our results showed that *Acetylcholinesterase collagenic tail peptide* (*colq*) was down-regulated by Cd exposure. This gene encodes for a protein that anchors the catalytic subunits of asymmetric acetylcholinesterase (AChE) to the synaptic basal lamina (Deprez et al. 2003). This down-regulation of *colq* could be linked to the down-regulation of another gene, i.e. utrophin (*utrn*; $\beta = -0.003$). UTRN is indeed found in postsynaptic cell membrane where it is involved in the clustering of acetylcholine receptors (Campanelli et al. 1994). As a down-regulation or a decreased activity of AChE is a well-known biomarker of liver damage (Xing et al. 2012), our results could suggest that chronic Cd exposure is responsible for liver damage in wild eels.

Interestingly, such biomarkers of tissue damage were associated with changes in the transcription level of genes involved in cell cycle regulation and apoptosis. First, the *activin receptor type-2A* (*acvr2a*) gene that encodes a receptor complex for Activin A protein was found to be up-regulated in Cd-contaminated fish ($\beta = 0.03$). Activin A protein is a member of the transforming growth factor- β super family (Letterio and Roberts 1998). These factors are known to be important mediators of apoptosis in liver (Rodgarkia-Dara et al. 2006). Such a result is consistent with the up-regulation ($\beta = 0.003$) of the *Band 4.1-like protein 3* (*epb41l3*) gene. This gene encodes a protein that inhibits cell proliferation and induces apoptosis (Li et al. 2011). In addition, the *pericentriolar material 1 protein* gene (*pcm1*) was found to be down-regulated in Cd-contaminated fish. PCM1 is known to be responsible for the correct localization of several centrosomal proteins that are required for regulation of centrosome structure at the G2/M transition and thus, for cell division (Hames and Crookes 2005). Cd contamination seems to affect genes involved in cell division and particularly mechanisms that are responsible to cell cycle arrest. Our results could indicate that chronic Cd exposure represses hepatocyte division. This

hypothesis is further supported by the fact that Cd contamination was also associated with an up-regulation of the *C-terminal binding protein 2* gene (*ctbp2*). CtBPs are transcriptional co-repressors acting via epigenetic mechanisms and more precisely by recruiting histone deacetylase and histone methyltransferase (Kim et al. 2005). It has been shown that these proteins serve as energy sensing-repressor. Their activation by low energy or NADH levels leads to repression of gene transcription and particularly to the down-regulation of genes involved in cell division. In this view, it is interesting to note that our results also showed that Cd exposure affects the transcription of genes involved in lipid transport and protein metabolism. Cd contamination was associated with an increase of *sortilin-related receptor* (*sor11*) gene transcription level, a multifunctional endocytic receptor that is involved in the uptake of lipoproteins and proteases from plasma. This enzyme notably presents a high affinity for apoE-rich lipoproteins and β -VLDL (Taira et al. 2011). Such an increase could appear in accordance with previous results obtained by Pierron et al. 2007 who reported a significant increase in lipolysis and energy needs in the liver of eels experimentally exposed to dissolved Cd at $5 \mu\text{g L}^{-1}$ during 30 days. Finally, two genes encoding enzymes involved in ubiquitin conjugation pathway were also affected by Cd contamination. The gene *E3 ubiquitin-protein ligase UBR5* (*ubr5*) which encodes a protein responsible for protein ubiquitination and thus to their degradation by the proteasome (Ernst et al. 2011), was found to be down-regulated in response to metal contamination. In contrast, the *ubiquitin carboxyl terminal hydrolase 20* gene (*usp20*) that encodes an enzyme that leads to protein deubiquitination was found to be up-regulated. This could potentially limit protein turnover and thus limit energy expenditure. It is interesting to note that a similar pattern was reported in wild yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to Cd pollution (Pierron et al. 2011). Using RNA-seq, authors hypothesized that chronic Cd exposure leads to energy restriction and to the activation of epigenetic mechanisms responsible for gene silencing, notably on genes involved in lipid and protein metabolism.

Lindane

First, two genes involved in transcription (Table 2), i.e. *mediator of RNA polymerase II transcription subunit 13* (*med13*) and *RNA-binding protein 4B* (*rbm4b*), were both up-regulated at the same level ($\beta = 0.06$) in γ -HCH contaminated-fish. *Med13* encodes a transcriptional co-activator that is required for the expression of all RNA polymerase II-dependent genes (Zhang et al. 2005). RBM4B is involved in mRNA processing (Lin et al. 2012).

Up-regulation of these two genes could indicate a general increase in cell transcriptional activity.

This potential increase in transcriptional activity was coupled with an up-regulation of several genes involved in lipid catabolism. Indeed, our results showed an up-regulation of the *carnitine-O-palmitoyltransferase 2* (*cpt2*) and *mitochondrial coenzyme A transporter SLC 25A42* (*slc25a42*) genes. These genes encode for enzymes involved in mitochondrial fatty acid β -oxidation (Kang et al. 2007). Moreover, these up-regulations were associated to an up-regulation of the *peroxisomal membrane protein PEX13* gene (*pex13*; $\beta = 0.06$). This gene encodes for a protein that is involved in the peroxisomal degradation of long chain fatty acids (Mannaerts 2000). Because mitochondrial β -oxidation can only use short and median fatty acids to generate energy (Mannaerts 2000), the up-regulation of *pex13* could contribute to provide to mitochondria short fatty acids via degradation of long fatty acids. It is interesting to note that *oxysterol-binding protein 2* (*osbp2*), involved in lipid transport and cholesterol metabolism, was also up-regulated. Thus, our results tend to show that chronic exposure to γ -HCH triggers an increased lipolysis and energy production in eels. Such a result is consistent with a previous study carried out on *Daphnia magna* which showed that exposure to sub-lethal concentrations of γ -HCH triggers an increase in the Krebs' cycle activity (De Coen et al. 2001). These up-regulations of transcriptional activity and energy metabolism were further associated with changes in the transcription level of genes that are known to be involved in tumorigenesis. First, the gene *serine protease hepsin* (*hpn*) was found to be up-regulated. This gene encodes for a protein that plays an essential role in cell growth (Nakamura et al. 2008). This gene is known to have prominent expression in human liver, prostate and ovarian tumors (Herter et al. 2005). Such a potential role of γ -HCH in tumorigenesis in eel liver is further supported by the significant decrease in *zinc-finger protein 148* (*znf148*) gene transcription level in γ -HCH-contaminated fish. This gene presents anti-tumor properties when over-expressed in hepatocellular carcinoma by increasing apoptotic processes (Zhang et al. 2012). Furthermore, it is noteworthy that a gene encoding a protein involved in hemophilic cell-cell adhesion, the *myelin protein zero-like protein 2* gene (*mpz12*) was also down-regulated. A loss of hemophilic cell-cell adhesion molecules induces signals promoting cell proliferation and migration and thus, tumor progression (Craig and Brady-Kalnay 2011). In contrast, a gene described to have a tumor suppressor role in colorectal cancers and in malignant thyroid tumors (Mlakar et al. 2009; Arnaldi et al. 2005), i.e. the decorin gene (*dcn*), was up-regulated in our findings ($\beta = 0.12$). We must note however that the primary role of *dcn* is to control extracellular matrix assembly. DCN is

known to be expressed during hepatic fibrosis (Baghy and László 2010). This could be in accordance with a study that reported hepatic fibrosis in several fish species exposed to accidental discharge of γ -HCH (Ortiz et al. 2003). To conclude, our results show that chronic γ -HCH exposure is associated with an up-regulation of global transcriptional activity and lipolysis. This up-regulation of cellular metabolism was further associated with changes in the transcription level of genes involved in tumorigenesis, suggesting that γ -HCH could lead to cancer development in eels. This tumor promoter role of γ -HCH had already been described in fish by Kroll et al. (1999). An alternative hypothesis would be that this increase in cellular metabolism and cell proliferation are signs of liver regeneration (King and Newmark 2012). Indeed, γ -HCH was reported to trigger hepatocyte necrosis in fish (Ortiz et al. 2003).

Conclusion

Our approach allowed us to establish significant relationships between the hepatic expression levels of specific transcripts and the concentrations of individual contaminants measured in fish. The aim was to identify some genes that are more likely related to a given factor. The genes identified for each anthropogenic or natural factor were involved in numerous and common biological processes. For example, fish HSI and Cd contamination were associated with changes in the transcription levels of genes involved in the p53 signaling pathway and in the lipid and protein metabolism, suggesting an effect of Cd on the hepatic energy metabolism. In this view, it is interesting to note that some discrepancies appear between our work and previous field transcriptomic studies. For example, in the studies carried out by (Pujolar et al. 2012, 2013), during which the transcriptome of eels from a clean site was compared with the transcriptome of eels from polluted sites by means of DNA microarray, significant changes in the transcription level of genes involved in detoxification, in the fight against oxidative stress and in the general stress response (e.g. metallothioneins, heat shock proteins) were observed. Such genes have not been highlighted in our study. This could be linked to the fact that our statistical approach (i.e. FAMT analysis) aimed to eliminate as much as possible genes for which transcription levels are correlated with several factors. However, such genes are known to vary in response to many factors, including both anthropogenic (including both metals and organic pollutants) and natural (e.g. temperature, hypoxia, age...) (Bœuf and Payan 2001; Podrabsky and Somero 2004) factors. Our study thus proposes an alternative method that could give more specific “signatures” of exposure. Further studies are however required at the protein level to test whether such

variations in gene transcription levels are associated with adverse effects in eels and to deepen our understanding about the mechanisms of toxicity of pollutants in wild contaminated fish.

Acknowledgments We wish to acknowledge the contributions of our support staff, without whom this study could not have been completed. First, we would like to thank all the personnel of INRS-ETE and UMR EPOC (University of Bordeaux) who participated in the field sampling, and also Patrick Girard and Pierre Elie for veterinary expertise. We would thank Charline Gesset for technical assistance. This work was supported by the ANR-CRSNG IMMORTEEL (ANR-10-INTB-1704) and by Aquitaine region (GAGILAU and MICANG projects). Lucie Baillon was supported by a collaborative doctoral fellowship between the University of Bordeaux (France) and the University of Laval (Quebec, Canada).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Arnaldi L, Borra R, Maciel R, Cerruti J (2005) Gene expression profiles reveal that DCN, DIO, and DIO2 are underexpressed in benign and malignant thyroid tumors. *Thyroid* 15(3):210–221
- Baghy KK, László V (2010) Ablation of the decorin gene enhances experimental hepatic fibrosis and impairs hepatic healing in mice. *Lab Invest* 91:439–451
- Barbier O, Jacquillet G, Tauc M, Cougnon M, Poujeol P (2005) Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. *Nephron Physiol* 99:105–110
- Bell SE, Sanchez MJ, Spasic-Boskovic O, Santalucia T, Gambardella L, Burton GJ, Murphy JJ, Norton JD, Clark AR, Turner M (2006) The RNA Binding Protein Zfp361l Is Required for Normal Vascularisation and Post-transcriptionally Regulates VEGF Expression. *Dev Dyn* 235:3144–3155
- Belpaire C, Goemans G (2007) Eels: contaminant cocktails pinpointing environmental contamination. *ICES J Mar Sci* 64(7):1423–1436
- Bœuf G, Payan P (2001) How should salinity influence fish growth? *Comp Biochem Physiol C* 130:411–423
- Burger A, Amemiya Y, Kitching R, Seth AK (2006) Novel RING E3 ubiquitin ligases in breast cancer. *Neoplasia* 8(8):689–695
- Campanelli JT, Roberds SL, Campbell KP, Scheller RH (1994) A role of dystrophin-associated glycoproteins and utrophin in agrin-induced AChR clustering. *Cell* 77:663–674
- Causeur D (2011) Factor analysis for multiple testing (famt): an r package for large-scale significance testing under dependence. *J Stat Softw* 40(14):1–19
- Chellappa S, Huntingford FA, Strang RHC, Thomson RY (1995) Condition factor and hepatosomatic index as estimates of energy status in male three-spined stickleback. *J Fish Biol* 47(5):775–787
- Clevers H, Nusse R (2012) Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* 149(6):1192–1205
- Coudret R (2013) Stochastic modelling using large data sets: applications in ecology and genetics. PhD. Dissertation, Bordeaux 1 University, Bordeaux
- Craig SEL, Brady-Kalnay SM (2011) Cancer cells cut homophilic cell adhesion molecules and run. *Cancer Res* 71(2):303–309
- De Coen W, De Janssen C, Segner H (2001) The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing V. In vivo alterations in the carbohydrate metabolism of *Daphnia magna* exposed to sublethal concentrations of mercury and lindane. *Ecotoxicol Environ Safe* 48:223–234

- de Lafontaine Y, Gagnon P, Côté B (2010) Abundance and individual size of American eel (*Anguilla rostrata*) in the St. Lawrence River over the past four decades. *Hydrobiologia* 647:185–198
- Deisenroth C, Zhang Y (2011) The ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway and energy metabolism bridging the gap between feast and famine. *Genes Cancer* 2(4):392–403
- Deprez P, Inestrosa NC, Krejci E (2003) Two different heparin-binding domains in collagen tail subunit of synaptic the triple-helical domain of ColQ, the acetylcholinesterase. *J Biol Chem* 278:23233–23242
- Durrieu G, Maury-Brachet R, Girardin M (2005) Contamination by heavy metals (Cd, Zn, Cu, and Hg) of eight fish species in the Gironde estuary (France). *Estuaries* 28(4):581–591
- Ernst R, Claessen JHL, Mueller B, Sanyal S, Spooner E, van der Veen AG et al (2011) Enzymatic blockade of the ubiquitin-proteasome pathway. *PLoS Biol* 8(3):e1000605
- Friguet C, Kloareg M, Causeur D (2009) A factor model approach to multiple testing under dependence. *J Am Stat Assoc* 104(488):1406–1415
- Geeraerts C, Belpaire C (2010) The effects of contaminants in European eel: a review. *Ecotoxicology* 19:239–266
- Gibellini F, Smith TK (2010) The Kennedy pathway de novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life* 62(6):414–428
- Graham R, Chua A (2007) Liver iron transport. *World J Gastroenterol* 13(35):4725–4736
- Hames R, Crookes R (2005) Dynamic recruitment of Nek2 kinase to the centrosome involves microtubules, PCM-1, and localized proteasomal degradation. *Mol Biol Cell* 16:1711–1724
- Hartwig A (2001) Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions: differential effects on structure and function. *Antioxid Redox Signal* 3(4):625–634
- Herter S, Piper DE, Aaron W, Gabriele T, Cutler G, Cao P, Bhatt AS, Choe Y, Craik CS, Walker N, Meininger D, Hoey T, Austin RJ (2005) Hepatocyte growth factor is a preferred in vitro substrate for human hepsin, a membrane-anchored serine protease implicated in prostate and ovarian cancers. *Biochem J* 390:125–136
- Higashiyama T (2002) Novel functions and applications of trehalose. *Pure Appl Chem* 74(7):1263–1269
- Hodson PV, Castsnguy M, Couillard CM, Desjardins C, Pelletier E, Mcleod R (1994) Spatial and temporal variations in chemical contamination of American eels, *Anguilla rostrata*, captured in the estuary of the St. Lawrence River. *Can J Fish Aquat Sci* 51:464–478
- Horn HF, Vousden KH (2008) Cooperation between the ribosomal proteins L5 and L11 in the p53 pathway. *Oncogene* 27:5774–5784
- ICES (2009) Report of the 2009 Session of the Joint EIFAC/ICES Working Group on Eels (WGEE), 7–12 September 2009, Göteborg, Sweden. ICES CM 2009, 137
- Kang HW, Bhimidi GR, Odom DP, Brun PJ, Fernandez ML, McGrane MM (2007) Altered lipid catabolism in the vitamin A deficient liver. *Mol Cell Endocrinol* 271:18–27
- Kim J, Cho E, Kim S, Youn H (2005) CtBP represses p300-mediated transcriptional activation by direct association with its bromodomain. *Nat Struct Mol Biol* 6(24):3070–3077
- King R, Newmark P (2012) The cell biology of regeneration. *J Cell Biol* 196(5):553–562
- Kroll B, Kunz S, Klein T, Schwarz LR (1999) Effect of lindane and phenobarbital on cyclooxygenase-2 expression and prostanoid synthesis by kupffer cells. *Carcinogenesis* 20(8):1411–1416
- Labadie P, Alliot F, Bourges C, Desportes A, Chevreuil M (2010) Determination of polybrominated diphenyl ethers in fish tissues by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry: case study on European eel (*Anguilla anguilla*) from Mediterranean coastal lagoons. *Anal Chim Acta* 675(2):97–105
- Labunskyy VM, Dolph LH, Gladyshev VN (2007) The Sep15 protein family: roles in disulfide bond formation and quality control in the endoplasmic reticulum. *IUBMB Life* 59(1):1–5
- Lapointe D, Pierron F, Couture P (2011) Individual and combined effects of heat stress and aqueous or dietary copper exposure in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 104:80–85
- Lee K, Nagler J, Fournier M, Lebeuf M, Cyr D (1999) Toxicological characterization of sediments from Baie des Anglais on the St Lawrence Estuary. *Chemosphere* 39(6):1019–1035
- Lee S, Kim JY, Kim Y, Seok K, Kim JH, Chang YJ (2012) Nucleolar protein GLTSCR2 stabilizes p53 in response to ribosomal stresses. *Cell Death Differ* 19(10):1613–1622
- Letterio J, Roberts A (1998) Regulation of immune responses TGF- β . *Annu Rev Immunol* 16:137–161
- Li X, Zhang Y, Zhang H, Liu X, Gong T, Li M (2011) miRNA-223 promotes gastric cancer invasion and metastasis by targeting tumor suppressor EPB41L3. *Mol Cancer Res* 9(7):824–833
- Lin JC, Yan YT, Hsieh WK, Peng PK, Su CH, Tarn WY (2012) RBM4 promotes pancreas cell differentiation and insulin expression. *Mol Cell Biol* 33(2):319–327
- Mannaerts G (2000) Peroxisomal lipid degradation via β - and α -oxidation in mammals. *Cell Biochem Biophys* 32:73–87
- Martínez-Moreno JM, Muñoz-Castañeda JR, Herencia C, Pérez-Martínez A, Aguilera-Tejero E, Canalej A (2012) In vascular smooth muscle cells paricalcitol prevents phosphate-induced Wnt/b-catenin activation. *Am J Physiol Ren Physiol* 303:1136–1144
- Martín-Pardillos A, Sosa C, Sorribas V (2013) Arsenic increases P_i-mediated vascular calcification and induces premature senescence in vascular smooth muscle cells. *Toxicol Sci* 131(2):641–653
- Min L, Xu H, Wang J, Qu L, Jiang B, Zeng Y (2013) N-acetyltransferase 10 protein is a negative regulator of 28S proteasome through interaction with PA28b. *FEBS Lett* 587:1630–1637
- Mrak V, Berginc G, Volavsek M, Stor Z, Rems M, Glavac D (2009) Presence of activating KRAS mutations correlates significantly with expression of tumour suppressor genes DCN and TPM1 in colorectal cancer. *BMC Cancer* 9:282
- Mohamed MM, Sloane BF (2006) Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:764–775
- Mortazavi A, Williams B, McCue K (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* 5(7):621–628
- Nakamura K, Takamoto N, Abarzua F, Hongo A, Kodama J, Nasu Y, Kumon H, Hiramatsu Y (2008) Hepsin inhibits the cell growth of endometrial cancer. *Int J Mol Med* 22:389–397
- Oikari S, Ahtialansaari T, Heinonen MV, Mauriala T, Auriola S, Kiehne K (2008) Down-regulation of PPARs and SREBP by acyl-CoA-binding protein over-expression in transgenic rats. *Eur J Physiol* 456:369–377
- Ortiz JB, Luisa Gonzales de Canales M, Sarasquete C (2003) Histopathological changes induced by lindane (γ -HCH) in various organs of fishes. *Sci Mar* 67(1):53–61
- Pierron F, Baudrimont M, Bossy A, Bourdineaud JP, Brêthes D, Elie P, Massabuau JC (2007) Impairment of lipid storage by cadmium in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquat Toxicol* 88:304–311
- Pierron F, Normandeau E, Defo MA, Campbell PGC, Bernatchez L, Couture P (2011) Effects of chronic metal exposure on wild fish populations revealed by high-throughput cDNA sequencing. *Ecotoxicology* 20(6):1388–1399

- Podrabsky JE, Somero GN (2004) Changes in gene expression associated with acclimation to constant temperatures and fluctuating daily temperatures in an annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *J Exp Biol* 207:2237–2254
- Pujolar JM, Marino IAM, Massimo M et al (2012) Surviving in a toxic world: transcriptomics and gene expression profiling in response to environmental pollution in the critically endangered European eel. *BMC Genomics* 13:507
- Pujolar JM, Milan M, Marino IAM, Capoccioni F, Ciccotti E, Belpaire C, Covaci A, Malarvannan G, Patarnello T, Bargelloni L, Zane L, Maes GE (2013) Detecting genome-wide gene transcription profiles associated with high pollution burden in the critically endangered European eel. *Aquat Toxicol* 132–133:157–164
- Quinlan A, Stewart D, Strömberg M, Marth G (2008) Pyrobayes: an improved base caller for SNP discovery in pyrosequences. *Nat Methods* 5(2):179–181
- Regier N, Baerlocher L, Münsterkötter M, Farinelli L, Cosio C (2013) Analysis of the elodea nuttallii transcriptome in response to mercury and cadmium pollution: development of sensitive tools for rapid ecotoxicological testing. *Environ Sci Technol* 47:8825–8834
- Rodgarkia-Dara C, Vejda S, Erlach N (2006) The activin axis in liver biology and disease. *Muta Res* 613:123–137
- Rowling MJ, Gliniak C, Welsh J, Fleet JC (2007) High dietary vitamin D prevents hypocalcemia and osteomalacia in CYP27B1 knockout mice. *J Nutr* 137:2608–2615
- Stone R (2003) Freshwater eels are slip-sliding away. *Science* 302(5643):221–222
- Taira K, Bujo H, Hirayama S (2011) LR11, a mosaic LDL receptor family member, mediates the uptake of ApoE-rich lipoproteins in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc* 21:1501–1506
- Tapie N, Budzinski H, Le Ménach K (2008) Fast and efficient extraction methods for the analysis of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in biological matrices. *Anal Bioanal Chem* 391:2169–2177
- Tapie N, Le Menach K, Pasquaud S, Elie P, Devier MH, Budzinski H (2011) PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary: from glass eels to silver eels. *Chemosphere* 83:175–185
- Thrush SF, Hewitt JE, Dayton PK, Coco G, Lohrer AM, Norkko A (2009) Forecasting the limits of resilience: integrating empirical research with theory. *Proc R Soc Lond B* 276(1671):3209–3217
- Van Aggelen G, Ankley GT, Baldwin WS, Bearden DW, Benson WH, Chipman JK (2010) Integrating omic technologies into aquatic ecological risk assessment and environmental monitoring: hurdles, achievements, and future outlook. *Environ Health Perspect* 118(1):1–5
- Vlaanderen J, Moore LE, Smith MT, Lan Q, Zhang L, Skibola CF (2010) Application of OMICS technologies in occupational and environmental health research; current status and projections. *Occup Environ Med* 67(2):136–143
- Webster TU, Bury N (2013) Global transcriptome profiling reveals molecular mechanisms of metal tolerance in a chronically exposed wild population of brown trout. *Environ Sci Technol* 47:8869–8877
- Xing H, Wu H, Sun G, Zhang Z, Xu S, Li S (2012) Alterations in activity and mRNA expression of acetylcholinesterase in the liver, kidney and gill of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. *Environ Toxicol Pharmacol* 35:47–54
- Yoshida T (2005) The involvement of thioredoxin and thioredoxin binding protein 2 on cellular proliferation and aging process. *Ann N Y Acad Sci* 1055:1–12
- Zhang X, Krutchinsky A, Fukuda A, Chen W, Yamamura S, Chait BT, Roeder RG (2005) MED1/TRAP220 exists predominantly in a TRAP/Mediator subpopulation enriched in RNA Polymerase II and is required for ER-mediated transcription. *Mol Cell* 19:89–100
- Zhang CZ, Cao Y, Yun JP, Chen GG, Lai PBS (2012) Increased expression of ZBP-89 and its prognostic significance in hepatocellular carcinoma. *Histopathology* 60(7):1114–1124

3. Conclusion

La campagne d'échantillonnage d'anguilles réalisée sur deux estuaires et leurs affluents a permis d'établir un constat plus récent de l'état de contamination de ces écosystèmes. Aujourd'hui, au travers de l'étude de bioaccumulation des contaminants dans les anguilles jaunes, il apparaît que l'estuaire de la Gironde semble sensiblement plus contaminé que l'estuaire du Saint-Laurent. La politique mise en œuvre au Québec pour la réhabilitation des terrains contaminés à partir de la fin des années 1990 pourrait en partie expliquer ces résultats.

L'approche haut débit du transcriptome du foie a permis d'identifier 18115 séquences présentant des fonctions biologiques connues dont 11547 identifiés en tant que gène unique. Parmi ces gènes uniques, le niveau de transcription de 1523 gènes a pu être relié significativement à un facteur anthropique ou naturel. Concernant les métaux, le Cd et l'As ont été reliés à 164 et 140 gènes respectivement et dans une moindre mesure le mercure et l'argent ont été reliés à 60 et 76 gènes respectivement. Si le cadmium montrait de fortes variations en termes de concentrations entre les sites (0.47 à $52.3 \mu\text{g.g}^{-1}$), l'arsenic quant à lui ne montrait qu'une faible variation (0.97 à $6.33 \mu\text{g.g}^{-1}$) mais représentait pourtant le second métal avec le plus grand nombre de gènes associés. Ce résultat suggérerait un fort effet de l'arsenic sur l'organisme en dépit de sa plus faible présence dans l'environnement et les organismes. Les concentrations en argent dans les reins des anguilles montraient une variation inter-sites importante par rapport à l'arsenic (0.08 à $3.38 \mu\text{g.g}^{-1}$) mais étaient associées à deux fois moins de gènes. Ce dernier résultat pourrait appuyer l'hypothèse que l'arsenic, même à faible concentration, représente un fort potentiel toxique pour les organismes aquatiques et a contrario, l'argent aurait un impact moins fort. Concernant les contaminants organiques, le lindane a été associé à un total de 180 gènes alors qu'il n'était retrouvé qu'en très faible concentration dans les muscles des anguilles. A l'opposé, les PCBs, retrouvés avec un facteur de bioaccumulation 60 entre les anguilles des différents sites, n'étaient reliés qu'à seulement 15 gènes. Ces résultats pourraient suggérer que le lindane aurait un impact plus marqué chez les organismes que les PCBs par exemple en dépit de sa faible présence dans les sites échantillonnés. Parmi les gènes identifiés, aucun ne codait pour des gènes de stress oxydatif ou de stress général tels que les métallothionéines ou les protéines HSP. Cette observation pourrait être due au fait que nous avons pris en compte également les facteurs naturels (salinité et température notamment) et ces marqueurs de stress général pourraient répondre tant à un stress anthropique que naturel. Or le but de la présente étude était d'éliminer ces

marqueurs non spécifiques, soulignant ainsi que la méthode adoptée a permis d'atteindre l'objectif, celui de démêler les effets spécifiques d'un facteur en milieu naturel. En effet, les gènes associés à des facteurs naturels, où la température et la salinité ont été reliées à 106 et 92 gènes respectivement. Ce nombre non négligeable de gènes, associés à des facteurs naturels, soulignent l'influence notable de ces facteurs sur le transcriptome des anguilles. Une analyse FAMT plus restrictive réalisée sur les facteurs associés à un grand nombre de gènes (i.e., l'indice hépato-somatique (HSI), l'As, le Cd et le lindane) a permis de relier plus précisément un facteur à un ensemble de gènes, considéré comme la « signature transcriptomique » spécifique du facteur. Les résultats de l'analyse ont permis de mettre en évidence l'influence commune du HSI et du Cd sur des gènes impliqués dans la voie de signalisation p53 mais aussi dans le métabolisme des lipides suggérant un effet de ce métal sur le métabolisme énergétique du foie. La « signature transcriptomique » de l'As fut quant à elle associée à des gènes impliqués dans la vasculogénèse, suggérant une atteinte vasculaire du foie en présence de ce métal. Enfin, les gènes associés au lindane étaient plutôt impliqués dans des processus de prolifération cellulaire, suggérant un effet tumoral possible de ce contaminant chez les poissons.

Cette étude nous a ainsi permis d'attribuer une signature transcriptomique spécifique à un contaminant chez des individus prélevés en milieux naturels. Cependant, ces signatures identifiées sur le terrain à partir d'analyses de corrélation correspondent-elles vraiment aux facteurs identifiés ? En outre ces signatures permettent-elles d'identifier et de démêler les effets des contaminants sur le terrain ? Ces questions feront l'objet du prochain chapitre.

Chapitre 4

*Comparaison des réponses transcriptomiques
hépatiques en conditions naturelles et de laboratoire
au moyen de la puce ADN*

1. Introduction

Au cours du chapitre 3, nous avons établi des liens entre des profils d'expression de gènes à un contaminant particulier mais aussi à des facteurs naturels abiotiques comme la température. Si cette étude a permis d'établir des « signatures » d'un facteur naturel ou anthropique et donc potentiellement de nouveaux biomarqueurs, la réalisation de l'ensemble des analyses reste couteuse et les analyses bioinformatiques restent encore complexes et longues (Kircher et Kelso, 2010). Cela nous a ainsi amenés à développer un autre outil de transcriptomique, la puce à ADN, un outil plus rapide et moins couteux que le séquençage haut débit et aujourd'hui largement utilisé en écotoxicologie (Poyton et al. 2008 a,b, Pujolar et al. 2012). Cette puce a été construite à partir des résultats issus du séquençage et de l'analyse FAMT incluant l'ensemble des facteurs décrits au cours du chapitre 3. Cette puce a été construite avec 1000 gènes « candidats », en d'autres termes 1000 gènes reliés chacun à un facteur particulier.

Dans ce chapitre 4 nous avons, au moyen de la puce à ADN, établi des profils d'expression des gènes chez des individus exposés au laboratoire à des polluants métalliques, le Cd et le MeHg et organiques (PCBs et OCPs). Les conditions d'exposition aux OCPs à la plus forte concentration (130 ng.g⁻¹ PS) et au MeHg à la plus faible concentration (0,5µg.g⁻¹ PS) n'ont pu être utilisées du fait d'une forte mortalité des animaux durant l'expérience. Les profils transcriptomiques ont également été établis chez les animaux exposés aux facteurs abiotiques naturels, la salinité, la température et la sous-alimentation. Ces profils ont ensuite été comparés à ceux établis chez des individus « sauvages » provenant de différents sites d'échantillonnage le long des estuaires du Saint-Laurent et de la Gironde. La comparaison de ces profils « multi-contaminés » avec des profils d'individus exposés à une seule molécule en laboratoire avait pour objectif de renforcer les liens établis au cours de l'analyse RNA-Seq et tester la possibilité d'utiliser la puce à ADN pour détecter d'une part les différents contaminants présents dans le milieu naturel et d'autre part de hiérarchiser les effets des contaminants sur les organismes sauvages.

2. Article

Title: Gene transcription profiling in wild and laboratory-exposed eels reveals common responses to low temperature and chronic pollution exposure

Authors : Lucie Baillon^{1,2}, Fabien Pierron^{1,2}, Pauline Pannetier³, Eric Normandeau⁴, Pierre Labadie^{1,2}, Hélène Budzinski^{1,2}, Patrick Lambert⁵, Patrice Couture³, Louis Bernatchez⁴, Magalie Baudrimont^{1,2}

¹Univ. Bordeaux, UMR EPOC CNRS 5805, F-33400 Talence, France

²CNRS, EPOC, UMR 5805, F-33400 Talence, France

³Institut National de la Recherche Scientifique, Centre Eau Terre Environnement, 490 de la Couronne, Québec (Québec) G1K 9A9 Canada

⁴Département de biologie, Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS), Université Laval, Québec (Québec) G1V 0A6 Canada

⁵Irtsea, UR EABX, 50 avenue de Verdun-Gazinet, 33612 Cestas, France

Corresponding author: Fabien Pierron

f.pierron@epoc.u-bordeaux1.fr Tel: +33 556 223 927 FAX: +33 540 708 504

En préparation

Abstract

Aquatic ecosystems are subjected to a variety of man-induced stressors but also vary spatially and temporally due to variation in natural factors. In such complex environments, it remains difficult for ecotoxicologists to evaluate the effects of contaminants in wild organisms. The aim of the present study was to test the possibility to detect and unravel the effects of different anthropogenic and natural factors on wild fish by the use of a DNA microarray. Transcriptomic profiles from laboratory-exposed and wild fish sampled along a contamination gradient were compared. During laboratory experiments, fish were exposed to pollutants or natural factors under levels that were closed to those found in the sampling sites. A strong difference was observed between the transcriptomic patterns of wild and laboratory-exposed animals, suggesting a general stress induced by captivity in laboratory. Surprisingly, animals acclimatized to cold temperature clustered with fish from the most contaminated sites and shared common genes involved notably in epigenetic mechanisms. A possible energy saving strategy was suggested in cold-acclimated animals. This result may suggest that animals chronically exposed to contaminants develop a general defense/adaptation strategy against pollution through a general shunt in their basal metabolism, whatever the type of contaminants.

Keywords: DNA microarray, multi-stress, Atlantic eels, ecotoxicology, transcriptomic, *in situ*, experimental

1. Introduction

Human activities have dramatically increased the concentration of metallic and organic pollutants in aquatic environment Trush et al., 2009 ¹. The goal of ecotoxicology is to assess and predict the impact of these contaminants on organisms, populations and ecosystems. In this aim, experimental approaches were developed with model animals to understand and assess the impacts of contaminants in natural ecosystems. However, it remains difficult to extrapolate the results obtained in the laboratory to a realistic effect in natural environment due to the presence of other natural factors and due to the variations of these factors from one sampling site to another. Indeed, aquatic ecosystems are complex and dynamic entities which structure, composition and functioning change on a daily and seasonal basis in response to variations in natural factors. A huge challenge for ecotoxicologists is thus to distinguish the effects triggered by contaminants from those triggered by natural factors. It is even more difficult to detect and assess the contribution of individual contaminants in a multi-pollutant field context (Denslow et al., 2008²).

In this context, gene transcription profiling or transcriptomics has received increasing attention in recent years. By allowing the simultaneous measurement of the transcription level of a large number of genes belonging to various metabolic pathways, gene expression profiling analysis could be used to identify and provide mechanistic insights into pollutant toxicity as well as to provide chemical signatures of toxicity (Denslow et al., 2008; Pierron et al., 2011; Baillon et al., in press ²⁻³⁻⁴). Such signatures, that are constituted by a set of genes that respond to a particular factor, could be used to discern the effects of chemicals in pollutant mixtures (Poynton et al., 2008 a,b ⁵⁻⁶). The emergence of analytical tools allowing high-throughput sequencing of mRNA molecules has allowed ecotoxicologists to develop such approaches in wild and non-model organisms. In a previous work, we took advantage of RNA-Seq to discover without a non-targeted approach statistically confident “candidate genes” for which transcription levels were more likely related to contaminant exposure rather than to natural stressors. To do this, the transcriptome of 48 wild Atlantic eels collected in 8 sampling sites presenting a broad contamination gradient was sequenced (Baillon et al., 2014⁴). In parallel, the contamination levels of eels in 10 metals and 25 organic contaminants were determined. Historically abundant and widespread in Europe and North America, populations of Atlantic eels have suffered a sharp decline. The European species (*Anguilla anguilla*) is currently considered as critically endangered of extinction by the International Union for Conservation of Nature. The American eel (*Anguilla rostrata*) was recently

designated as threatened by the Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Among hypotheses advanced to explain these declines, the possible contribution of pollution has received considerable attention in recent years. The unusual life cycle of Atlantic eels makes them particularly vulnerable to pollution (Belpaire and Goemans, 2007; Geeraerts and Belpaire, 2010⁷⁻⁸). A total of 1000 candidate genes were retained and used to construct a DNA microarray (microarray data have been deposited with the NCBI/Gene Expression Omnibus (GEO) under accession number: GPL19017). The aim of the present study was first to establish specific transcriptomic profiles for different anthropogenic and natural factors under controlled laboratory conditions. The aim was to obtain a “gene expression signature” of each particular stressor (Ramaswamy et al. 2001⁹) by means of the microarray tool. The second aim was to test whether gene expression signatures could help to detect and unravel the effects of each stressor in wild fish chronically exposed to multiple stressors.

To do this, wild immature (yellow stage) Atlantic eels were sampled in two areas. First, European eels were captured along the hydrosystem Garonne–Gironde fluvio-estuary system (France) polluted by Cd and polychloro-biphenyls (PCBs) notably. American eels were captured along the St Lawrence hydrosystem that is marked, in a lesser extent to the Gironde estuary, by the presence of several trace metals and organic compounds (Baillon et al., in press⁴). For laboratory exposures, yellow European eels were caught in an uncontaminated site (Certes) and were exposed in the laboratory over a period of 45 days to various natural and anthropogenic factors. Pollutants selected for laboratory exposures were those found in high concentrations in eels sampled in the St Lawrence and Gironde hydrosystems such as PCBs, Cd, mercury (Hg) and organochlorinated pesticides (OCPs) (Baillon et al., in press⁴). During laboratory experiments, yellow eels were exposed to only one factor at a time. Although environmental exposures rarely contain a single stressor, these single physic-chemical studies are important because they set the stage against which responses to more complex exposures can be compared. Moreover, eels were exposed to concentrations that were equivalents to the contamination levels found in water or prey of eels inhabiting the Garonne-Gironde continuum (Tapie et al., 2011¹⁰). Finally, immature eels were exposed to natural stressors that showed the strongest variations among the natural sites, i.e. salinity and temperature. Eels were also submitted to food restriction, a factor known to influence fish metabolism (Dave et al., 1975¹¹). Then, “signatures” obtained from laboratory-exposed fish were compared with transcriptomic profiles obtained from wild Atlantic eels.

2. Material and methods

2.1 Wild eels sample collection

Seven sampling sites were selected in Canada (St. Jean, Sud-Ouest, St. François, St. Pierre) and in France (Dordogne, Garonne, Gironde) on the basis of their known gradient of contamination by metallic and organic pollutants previously described in Baillon et al., in press⁴. For each sampling site, a total of 5 fish were used for subsequent analyses. Fish were dissected as soon as possible and organs were divided into several samples. Samples for gene transcription analyses were stored in RNAlater at -20°C until needed. For both organic and metal analyses, samples were stored at -80°C.

2.2 Experimental Design

All procedures used in this experiment were approved by the Aquitaine fish-birds ethic committee. Immature yellow eels (*Anguilla anguilla*), averaging 37.7 cm in length and 75 g in weight (37.71 ± 5.05 cm and 75.00 ± 3.84 g, respectively, mean \pm SE, $n = 80$) were captured in Certes in May 2012. The animals were transferred to the laboratory (Marine Station of Arcachon) and kept in running aerated brackish water (salinity 5‰, natural seawater dilution with aerated tap water) thermostated at 23 degrees over a 1-month maintenance period, prior to experimentation. Over this period, fish were fed every day with mussels, and no lethality was observed.

The experiment was performed by means of a flow-through system consisting of ten separate 215 L experimental units (EU). Each tank was supplied with brackish water (salinity 5‰) by four water flow-meters and contained eight organisms per tank. During experiment, eels were feed every two days in excess (7.5% wet weight animal/day) with artificial food (fresh fish flesh mixed with oil (1.3%) and agar-agar (0.8%)). During the exposure, the unconsumed food was removed every morning, dried and weighed. For each UE, the dry weight of unconsumed food was subtracted from the total dry weight of given food to determine the percentage of food consumed, i.e. the food intake rate. Results are expressed as mean \pm SE ($n = 22$). Exposure to Cd and PCBs were carried out at two contamination levels in order to mimic the concentration range of these pollutants in prey of eels inhabiting along the two hydrosystems. Then, for PCBs exposure, this food was enriched in pyralene to reach a concentration of 50 ng.g⁻¹ and 300 ng.g⁻¹ dw. Pyralene solution consisted of a mixture of PCB 28, 52, 101, 118,

138, 153, 180, the seven priority PCBs in assessing the standard of environmental quality (US- EPA). For organochlorinated pesticide exposure (OCPs), food was enriched with a mix of OCPs solution to reach a concentration of 13 ng.g⁻¹dw. OCPs solution consisted of a mixture of 2,4' DDE (7.7% of 13 ng.g⁻¹ PS), 4,4' DDE + dieldrin (46%), 4,4' DDD (7.7%), 2,4' DDT (7.7%), 4,4' DDT(15.4%), lindane (7.7%) and transnonachlor (7.7%). Amount of each component was determined from their respective concentrations found in shrimp sampled in the Gironde estuary (unpublished data). For Hg exposure, the food was enriched in methyl-mercury solution to reach a concentration of 5 µg.g⁻¹ dw. For Cd exposure, animals were exposed to dissolved metal at a nominal concentration of 0.4 and 4 µg.L⁻¹. Metal exposure was initiated by adding Cd as CdCl₂ from a stock solution in water. To maintain constant Cd contamination over time, contaminated tanks were fitted with a peristaltic pump which added Cd at the desired concentration. The average Cd concentrations were 0.09 ± 0.01 µg.L⁻¹, 0.42 ± 0.04 µg.L⁻¹ and 4.00 ± 0.18 µg.L⁻¹ (mean ± SE, n = 18) in control and contaminated tanks, respectively. For our experiment, control animals were maintained in uncontaminated brackish water and fed with uncontaminated artificial food. For natural factor exposures, animals were maintained in the same conditions as controls. However, for the cold temperature exposure, animals were maintained in water thermostated at 13.4 ± 0.3 °C, (mean ± SE, n=34). For the high salinity exposure, the salinity was increased to 17.7 ± 0.2 ‰, (mean ± SE, n=36; natural seawater dilution with aerated tap water). For the food restriction condition, animals were fed at only 2% wet weight animal/day.

At the end of the exposure period, 5 eels per EU were removed and dissected. Samples of liver were immediately fixed in RNAlater solution and stored at -20 °C until needed for analyses. All experimental conditions are resumed in Table 1.

2.3 RNA extraction, labeling, and cDNA hybridization

Total RNA was extracted from liver of the 85 experimental and wild fish (5 individuals per condition or sampling site). RNAs were extracted from 15-25 mg of tissue using the SV total RNA isolation system (Promega) with minor modifications (see more details about the protocol through GEO Series accession number GSEXXX). Then, we used an indirect cDNA labelling method. During the first step 15 µg of total RNA was reverse transcribed with oligo-dT priming and amino-allyl-dUTP (Sigma). After RT reaction, cDNA purification was made with Qiagen PCR purification kit following the manufacturer's protocol. Purified cDNA were then labeled with CyDye™ Post-Labeling Reactive Dye Pack (Cyanine 3 for sample and

Cyanine 5 for reference). In order to normalize microarray data, we used a common reference design. The reference was composed by pooling total RNA from 30 wild eels from a clean site; i.e. Certes (15 fishes collected in year 2011 and 15 in year 2012). This reference was combined in equal amounts with each sample before to be hybridized on the microarray slide (one night at 55°C). A total of 85 microarrays were used, 5 microarrays were performed for the experimental conditions (see Table 1) and 5 for each sampling site (i.e. St. Jean, Sud-Ouest, St. Pierre, St. François, Dordogne, Gironde and Garonne). Each sample has been hybridized once on DNA microarray. Data acquisition was carried out by means of the Innoscan 710 microarray scanner (Innopsys) using Mapix software.

2.4 Metal and organic concentration analysis

For wild yellow eels, analyses of metal and organic pollutants were performed as described in Baillon et al., in press ⁴.

For laboratory Cd exposure, analyses were performed on liver and water samples following the procedures described by Pierron et al., 2007¹². For Hg analyses in experimental yellow eels, muscle samples were first dried at 45°C for 48 h before analysis. Total Hg concentrations in samples were determined by flameless atomic absorption spectrometry. Analyses were carried out automatically after thermal decomposition at 800°C under an oxygen flow (AMA 254, LECO France). Detection limit of the method was 0.1 ng Hg. The analytical method was validated using reference materials TORT2 (National Research Council of Canada, lobster hepatopancreas) every ten samples. Recoveries of certified reference material were 111±4%.

2.5 Data acquisition and analysis

Concerning contaminant and morphometric data, comparisons among fish groups were performed by analysis of variance (ANOVA), after checking assumptions of normality and homoscedasticity of the error terms. The Least Square Deviation test (LSD) was used to determine whether means between pairs of samples were significantly different from one another. Computations were performed using the statistical software Sigma Stat. For all statistical results, a probability of $P < 0.05$ was considered significant. Results are given as mean ± SE.

For gene expression analyses, details about the raw data acquisition of microarrays are available on GEO (geo@ncbi.nlm.nih.gov). Comparisons among fish groups were performed by using the class comparison test available in the BRB software (Simon et al., 2007¹³).

For hierarchical clustering analyses, an average linkage hierarchical clustering was done with centered correlation and genes options using all arrays with BRB array tools software. Cluster reproducibility and the robustness were examined by the method of Mcshane et al., 2002¹⁴ based on 100 permutations.

Functional classification and assessment of significant differential representation of functional classes were performed with the Blast2go software (<http://www.blast2go.com/b2ghome>) using Gene Ontology annotation.

3. Results and discussion

3.1 Contamination levels

Concerning the physic-chemical conditions of sampling sites, high variations were observed in term of temperature and salinity. Temperatures ranged from 12°C to 22°C. For salinity, Sud-Ouest showed the highest value reaching 16.5‰ compared with others French and Canadian sites that showed salinity comprised between 0 and 7.78‰. Concerning contaminants, the highest levels of contamination in both metallic and organic contaminants were observed in eels from France (Table 2). Significant increases in pollutant concentrations were observed along the French gradient from Dordogne → Garonne → Gironde. For Quebec, eels from St. Pierre and St. François were more contaminated than eels from St. Jean and Sud-Ouest site. Concerning metals, the highest variations were observed for Cd. Animals inhabiting the Gironde estuary appeared to be the most contaminated in Cd ($8.39 \pm 0.89 \mu\text{g.g}^{-1}$ dw). Eels from Dordogne and St. Pierre were the second most contaminated sites for this metal with a concentration level reaching $4.52 \pm 0.92 \mu\text{g.g}^{-1}$ and $4.47 \pm 1.64 \mu\text{g.g}^{-1}$ (dw) respectively (Table 2). For mercury, animals from St Pierre were the most contaminated with a concentration averaging $1.8 \pm 0.23 \mu\text{g.g}^{-1}$ dw. Concerning organic pollutants, eels from Gironde and Garonne were the most contaminated compared to fish from all other sampling sites. For example, muscle PCBs concentrations in eels from St. Pierre and Dordogne were 17- and 6-fold lower than in fish from Gironde, respectively.

In the aim to establish a transcriptomic pattern for a particular contaminant or a particular natural factor, laboratory exposures were conducted on immature yellow eels

collected in a clean site? Experimental conditions are summarized in Table 1. Contaminants and natural factors and their respective levels were chosen based on the results obtained in the field. Thus, we choose to exposed animals to Cd, Hg, PCBs and a mixture of OCPs as well as to a colder temperature and a higher salinity. First of all, laboratory animals did not show significant differences in term of length or weight among the different experimental conditions. Concerning the hepato-somatic index (HSI) animals acclimated to cold (13°C against 23 °C for controls) showed a significant higher HSI in comparison to other animals. For Hg and OCPs exposures that were carried out through the diet route (i.e. with food contaminated with mercury or OCPs), a significant bioaccumulation was observed in fish muscle in comparison to controls (Table 2). Surprisingly, even if eels exposed to PCBs-contaminated food at 50 ng.g⁻¹ (PCB_50) were fed with a food 6 times less contaminated than eels fed with PCBs-contaminated food at 300 ng.g⁻¹ (PCB_300), the concentration of PCBs in muscle of fish from the PCB_50 condition was significantly 2.7-times higher than in eels from the PCB_300 condition (Table 2). This could be explained by the low food intake rate of animals exposed to PCB_300. Indeed, for the PCB_300 condition, eels ate significantly less food in comparison to controls or fish of the PCB_50 condition (Table 2). As PCBs contamination was carried out by the trophic route, it could likely explain the low level of PCBs in eels exposed to the highest contamination pressure. Moreover, we must note that in term of PCBs bioaccumulation in fish muscle no significant difference was observed between controls and fish exposed to PCB_50 (Table 2). However, the amount of PCBs was twice as high in fish exposed to PCB_50 in comparison to controls.

3.2 Microarray analysis

Microarray analyses were conducted on the liver of animals from both the laboratory and field in order to test the potential usefulness of gene transcription signatures to predict and unravel the specific effects of contaminants in wild organisms. Thus, a hierarchical clustering analysis was performed on data obtained from both experimental and wild eels to assess the similarities and dissimilarities among the transcription profiles. In order to test a potential effect of the species, as both American and European eel species were used in the present study, two analyses were performed. The first analysis included all laboratory exposure conditions and only European wild eels (i.e. the species used for experimental investigations, Fig. 1A) and the second one included all laboratory and field conditions from both Canada and France (Fig. 1B). For both analyses, gene transcription profiles obtained from the

laboratory and wild animals were separated in two main distinct clusters (with few exceptions described below). In addition, wild fish from the two species were clustered together (Fig. 1B) suggesting that the “laboratory” effect was more important than a potential effect of the species. Thus, in the rest of the discussion, results from analyses carried out on the whole set of arrays will be discussed (i.e. Fig. 1B).

Concerning the cluster regrouping wild fish, the majority of animals from the highest contaminated sites, Garonne and Gironde, were grouped together (cluster 8). Animals from the two cleanest sites were grouped together in a separate cluster (St. Jean and Sud-Ouest; cluster 11). Moreover, it was interesting to see that intermediary contaminated fish were dispersed between both “contaminated” and “clean” clusters. Indeed, a part of eels from St. Pierre (n=3; cluster 8 and 9) and Dordogne (n=3; cluster 6 and 7) were grouped with the highest contaminated sites (Garonne and Gironde; cluster 8). For animals from St. François, the majority (n=3; cluster 10) were grouped with animals from “clean” sites (St Jean and Sud-Ouest; cluster 11). Although the majority of animals from the laboratory were separated from wild animals, animals from sites presenting intermediate levels of contamination (particularly for St. François and St Pierre) were grouped with some laboratory animals and more precisely with animals exposed to PCB_low (n = 4; cluster 10) and in a lesser extent to OCPs (n = 2; cluster 10). Interestingly, the bioaccumulation levels in fish muscle for these pollutants (Table 1) in animals from the Dordogne, St. Pierre and St. François sites were quite closed to those measured in experimental fish, comparatively to others sites. This could explain the grouping of their transcriptomic profiles. However, PCBs concentrations used in our experiments were based on the levels found in prey of eels inhabiting the Gironde estuary (Tapie et al., 2011¹⁰). This observation may suggest that in addition to the dose, the duration of exposure in laboratory seem to play an important role on the transcriptomic response of animals. In addition, the fact that experimental animals exposed to PCBs and OCPs were associated with fish from intermediary contaminated sites may suggest that under chronic long-life exposure conditions in the wild, a strong pressure of contamination may conduct to a less specific response to a particular contaminant but rather to a general response against pollution. Indeed, in dendrograms, Gironde and Garonne were grouped together. However, between these sites, salinity was different and regarding to the contamination levels of fish of these two sites; contamination appeared to be different with higher metallic contamination levels in eels from Gironde (Table 2). So, despite their differences in term of abiotic factors such as salinity and contamination, fish from Gironde and Garonne showed comparable transcriptomic profiles.

Nevertheless, the majority of experimental fish showed quite distinct gene transcription profiles from those determined in wild fish. So, it was interesting to identify the genes that were differentially regulated between laboratory and wild fish. A total of 190 genes (Table S1 in SI) were identified, 88 genes were found up-regulated and 102 genes were down-regulated in laboratory-exposed animals compared to wild animals. Then, an enrichment analysis with Fisher's exact test was performed on the 190 differentially expressed genes to highlight the most significant biological processes that differed between wild and experimental animals. The three diagrams in Fig. 2 showed the most specific biological functions that were significantly enriched between wild and laboratory eels. The first diagram (Fig. 2A) summarizes the principal functions represented among the 190 differentially transcribed genes. Among the down-regulated functions in laboratory-exposed eels (Fig. 2B), phagocytosis engulfment, protein targeting to membrane (N-terminal protein myristoylation) and regulation of the cell cycle (regulation of Cdc42 protein signal transduction and regulation of G2/M transition of mitotic cell cycle) were the most represented. First, changes in the transcription level of genes involved in cell cycle regulation may suggest a decrease in cell growth in laboratory animals and thus a potential decrease in their growth rate. Also, a change in protein targeting to membrane as well as in phospholipid metabolism may suggest a change in cell membrane structure and functioning (Wright et al., 2010¹⁵). Furthermore, in our results, genes implicated in phagocytosis were found down-regulated. Phagocyte activity is the response of innate immune system (Magnadottir, 2006¹⁶). Such results are in agreement with previous studies carried out on diverse fish species where handling, confinement and high biomass density were associated with lower growth rate, lower phagocytosis activity and changes in the transcription levels of genes involved in cellular homeostasis and protein folding (Pickering, 1993; Ortuno et al., 2001; Caldach-Giner et al., 2010)¹⁷⁻¹⁹. Concerning the European eel, captivity induces significant changes in the general metabolism of eels notably in term of growth rate and sex ratio (Beullens et al. 1997a,b)²⁰⁻²¹. In contrast, in laboratory animals, genes involved in macromolecule modification and in cell differentiation were found up-regulated. In link with the first diagram (Fig 2A), genes included in the functional class called histone modification where the same than those included in the functional classes called macromolecule modification, leukocyte differentiation, megakaryocyte differentiation and lung epithelial cell differentiation in Fig 2B. This may suggest that the majority of up-regulated genes in laboratory animals were involved in histone modification, i.e. epigenetic mechanisms. In our study, wild and laboratory animals were both exposed to pollutant and natural stressors and the present results could be thus mainly explained by an effect of

captivity. So our results could suggest that the effects of captivity could have mitigated the responses developed by animals to the several factors tested.

Surprisingly, in contrast to the other experimental conditions, all fish that were experimentally exposed to low temperature were clustered with wild animals. Thus it was interesting to focus first on gene associated with cold-acclimation. A total of 112 genes (Table S2 in SI) were differentially regulated between cold-acclimated fish and controls, 63 genes were found up-regulated and 49 genes down-regulated. Then, an enrichment analysis with Fisher's exact test was performed on the 112 differentially transcribed genes (Fig. 3). The first diagram (Fig. 3A) resume the principal biological functions represented among the 112 genes differentially expressed. Generally, down-regulated functions (Fig. 3B) were vitamin A metabolism, regulation of kinase and cytokine activities and biosynthesis of monocarboxylic acids. First, our results showed a decrease in the biosynthetic process of monocarboxylic acids that are fatty acids. It could suggest a decrease in energy stores in liver. Nevertheless, in a study where eels were acclimated to cold temperature at 10°C, animals did not show differences in liver triacylglycerol content compared to fish acclimated to 20°C but showed an increase in glycogen reserves and a higher rate of ketogenesis (Jankowsky et al., 1984²³). Ketogenesis is a metabolic pathway that is up-regulated during long starvation period or during hibernating and uses acetyl-CoA that comes from the breakdown of fatty acids to form ketone bodies. These compounds are used preferentially by the brain and heart to produce energy, i.e. ATP molecules (Andrews et al., 2009²⁴). Ketone bodies provide greater energy yield than glucose with a lower oxygen consumption (Andrews et al., 2009²⁴). Metabolism of vitamin A (or retinol), involved in several biological processes such as cell differentiation, immune system, hematopoiesis and gluconeogenesis (Pierron et al., 2011³), was also down-regulated in our results. Hematopoiesis and angiogenesis are closely linked (Suda et al., 2000²⁵). Such a result appears in accordance with the down-regulation of sprouting angiogenesis (Fig 3B) and to a decrease in the oxygen consumption rate of eels acclimated to cold (Jankowsky et al., 1984²³). Moreover, cytokine activity was down-regulated (Fig. 3B) in cold-acclimated animals and is involved in cell communication but also in the innate immune system (Calgani and Elenkov, 2006²⁶). This could be in accordance with the decrease of vitamin A metabolism. Thus, our results showed a decrease in fatty acid synthesis, retinol metabolism, sprouting angiogenesis and immune system. This may suggest a general decrease in metabolic activity. In ectotherms such as fish (including eels) acclimated to low temperature, it was shown that fish decrease their general metabolic activity in order to compensate the effect of cold temperature (Johnston and Dunn, 1987; Vergauwen et al., 2013

^{27,28}). Surprisingly, among functions that were found up-regulated, several pathways involved in response to growth factor stimulus, regulation of mitosis and mRNA processing were observed (Fig. 3C). As described above, this contrasts with the fact that fish acclimated to cold present lower metabolic rates. Despite a lower metabolic activity in cold-acclimated fish, many studies have shown an increase in mitochondria density in liver and muscle in order to compensate the lower activities of aerobic enzymes in fish acclimated at cold (Johnston and Dunn, 1987, Sidell, 1998, Gracey et al., 2004 ^{27,29,30}). In addition, in European eels acclimated to cold, an increase in the hepato-somatic index (HSI) of animals was reported. Such an increase was due to an increase in cell numbers (Johnston and Dunn, 1987 ²⁷). Accordingly, eels exposed to cold water (13°C) presented a significantly higher HSI than control eels (23°C) in our study (Table 1). Then the induction of growth factor signaling pathways, mitosis and mRNA processing may be in accordance with these observations.

Thus, the main functions that were affected in fish exposed to cold temperature were those involved in cell growth and immune system suggesting a general decrease of cell metabolism.

In Fig 1B, animals from the most contaminated sites Dordogne, Garonne, Gironde, and the coldest and contaminated site St Pierre (12 °C, table 1) appeared to have comparable transcriptomic profiles with cold-acclimated animals. We then analyzed the genes that were similarly regulated in animals exposed to low temperature and animals from the four contaminated sites. For this, statistical analyses were carried out to identify genes that were differentially expressed between controls and animals from each sampling sites. All these lists were then compared between them and 32 genes were commonly regulated between fish from the four contaminated sites and fish acclimated to cold (Table 3). In addition, a list of genes was also established between temperature_low exposure and fish from “clean sites”, i.e., St Jean, Sud-Ouest and St François and 22 genes were commonly found. Comparing the two lists, only 10 common genes were identified between temperature_low condition and contaminated sites (i.e. St Pierre, Dordogne, Garonne and Gironde).

First, genes were all regulated in the same direction and only one gene was found down-regulated among all conditions. This down-regulated gene, *Krueppel-like factor 12* confers strong transcriptional repression to the *tfap2a* gene. This genes encodes a transcription factor called AP-2-alpha that is involved in development and morphogenesis.. Also, among the up-regulated genes, there was the genes *arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein*, *TATA-binding protein-associated factor 2N*, *protein arginine N-methyltransferase 7* and *integral membrane protein 2A*. The gene *integral membrane protein*

2A (*itm2a*) was found to be highly expressed in adipose tissue mesenchymal stem cells (ASC) and was shown to inhibit their differentiation into chondrogenic cells (Boeuf et al., 2009³¹). The fact that in our study, this gene was up-regulated may suggest an inhibition of cell differentiation. Also, the gene *arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein* encodes for the protein RERE that acts as transcriptional co-repressor during embryonic development and that plays a role in the control of cell survival (Zoltewicz et al., 2004³²). The association between RERE and a histone deacetylase alters the structure of chromatin and silences transcription (Ng and Bird, 2000³³). Moreover the gene *protein arginine N-methyltransferase 7* mediates the symmetric dimethylation of histone H4 and the recruitment of DNA methyltransferases at these sites (Miranda et al., 2004³⁴). A recent transcriptomic analysis on wild yellow perch (*Perca flavens*) exposed chronically to metals (Cd and copper (Cu)) showed similar patterns. Indeed, chronic metal exposure was associated with a decrease in the transcription level of genes involved in immune system, in the retinol metabolism, lipid metabolism, and at the opposite with an up-regulation of genes encoding for proteins involved in epigenetic mechanisms (Pierron et al., 2011³). Moreover, metal-contaminated yellow perch presented a decrease in swimming performance and lower aerobic capacities (Rajotte and Couture, 2003³⁴). Then, it seems that in wild fish exposed chronically to a mix of pollutants a common and durable shunt in hepatic cell functioning is developed in order to adapt to life-long exposure to contaminant mixtures.

Acknowledgements

We wish to acknowledge the contributions of our support staff, without whom this study could not have been completed. First, we would like to thank Pr Richard Simon for his help in microarray analyses with BRB array tools. Thanks also to Patrick Girard for its veterinary expertise. This work was supported by the Regional Council of Aquitaine, the Agence Nationale de la Recherche of France (ANR Immortel ANR-10-INTB-1704) and a Strategic Project Grant of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to Patrice Couture and Louis Bernatchez. This work was also supported by the Investments for the future Program, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45).

Lucie Baillon was supported by a collaborative doctoral fellowship between the University of Bordeaux (France) and Université Laval (Québec, Canada).

Figure caption

Figure 1

Hierarchical clustering of hepatic transcriptomic profiles of experimental fish (see Table 1 for more details) and (A) wild eels from France (Dordogne, Garonne, Gironde) or (B) wild eels from France and Canada (St. Jean, Sud-Ouest, St. François, St. Pierre). For cluster description see text for more details.

Figure 2

Enriched biological processes and functional categories in laboratory versus wild fish (Fisher exact test, significance threshold: $P < 0.05$). Diagram 2A was carried out with the 190 genes differentially expressed between conditions, diagram 2B describes the down-regulated genes in laboratory fish and diagram 3B describes the up-regulated genes.

Figure 3

Enriched biological processes and functional categories in Control fish versus fish acclimated to cold (Fisher exact test, significance threshold: $P < 0.05$). Diagram 3A was carried out with the 112 genes differentially expressed between conditions, diagram 3B describes the down-regulated genes in cold-acclimated fish and diagram 3C describes the up-regulated genes.

Table 1: Summary of experimental conditions.

	Exposure condition	Contamination route	Water physical chemistry		Food ration (%)
			Salinity	Temperature °C	
Controls	/	/	5	23	7.5
Cd_low	[Cd] 0.4 µg.L ⁻¹	water	5	23	7.5
Cd_high	[Cd] 4 µg.L ⁻¹	water	5	23	7.5
Hg_lab	[Hg] 5 µg.g ⁻¹	Food	5	23	7.5
OCP_lab	[OCPs] 13 ng.g ⁻¹	Food	5	23	7.5
PCB_low	[PCBs] 50 ng.g ⁻¹	Food	5	23	7.5
PCB_high	[PCBs] 300 ng.g ⁻¹	Food	5	23	7.5
Diet_low	Food restriction	/	5	23	2
Salinity_high	High salinity	/	18	23	7.5
Temperature_low	Cold	/	5	13	7.5

Table 2: Morphometric measures (mean ± SE, n= 5) and average concentrations of muscle organic pollutants (expressed as ng.g⁻¹, dw) and liver metal concentrations (expressed as µg.g⁻¹, dw) in Atlantic eels sampled in 7 sites located in Canada and France. All data are expressed as means ± SE (n= 5 per site). Means designated with different letters are significantly different (LSD test, P < 0.05).

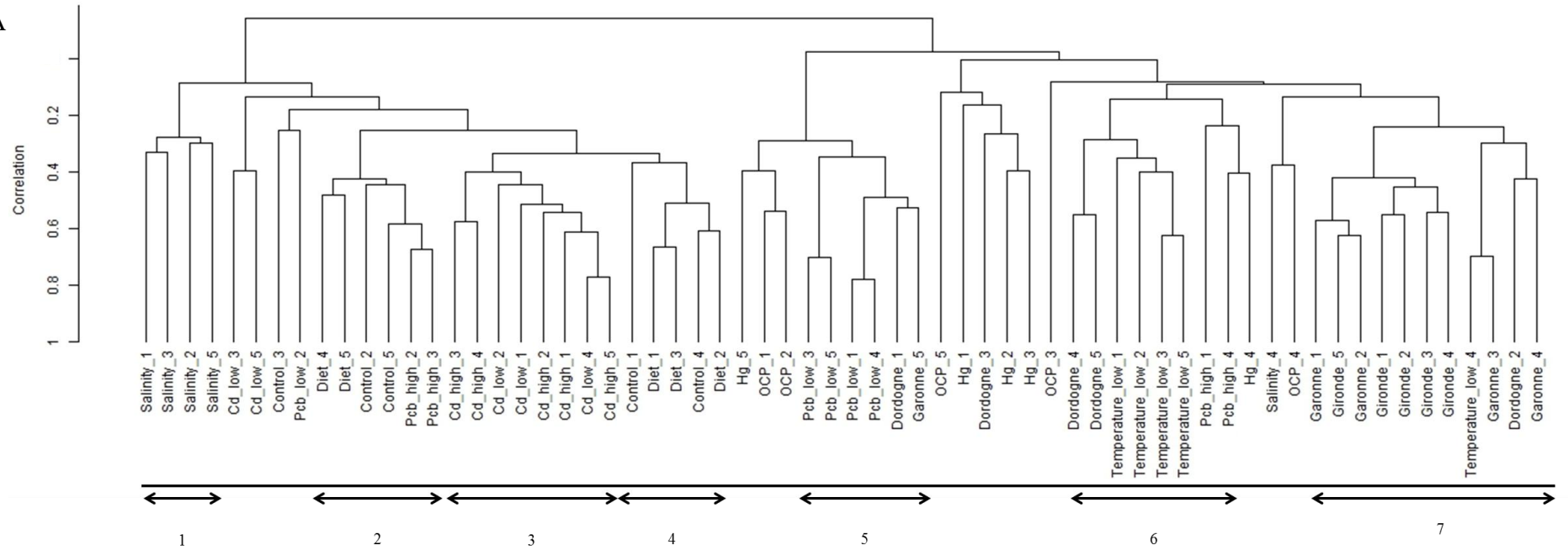
		Field							Laboratory									
		St Jean	Sud-Ouest	St François	St Pierre	Dordogne	Garonne	Gironde	Controls	Cd_low	Cd_high	Hg	OCP	PCB_low	PCB_high	Diet_low	Salinity_high	Temperature_low
Biometry	Length (mm)	473 ± 19.63 ^c	302.8 ± 15.39 ^e	878.4 ± 2.26 ^a	900.6 ± 8.76 ^a	363.8 ± 31 ^{d,e}	417.6 ± 6.34 ^{c,d}	602.2 ± 28.94 ^b	364 ± 6.12 ^a	368.8 ± 10.25 ^a	368 ± 6.57 ^a	397. 8± 21.54 ^a	402.6 ± 19.86 ^a	363.8 ± 5.40 ^a	376.25 ± 5.85 ^a	376 ± 9.85 ^a	358 ± 4.45 ^a	395.8 ± 14.23 ^a
	Weight (g)	190.6 ± 24.85 ^c	36 ± 5.88 ^e	1335 ± 19.62 ^a	1271.4 ± 76.1 ^a	87.4 ± 29.02 ^d	118.6 ± 0.55 ^d	403.8 ± 63.52 ^b	68.66 ± 5.25 ^a	69.2 ± 7.76 ^a	65.8 ± 4.75 ^a	85.4 ± 14.53 ^a	97 ± 18.4 ^a	83 ± 8.04 ^a	64.5 ± 5.17 ^a	81 ± 5.61 ^a	56.2 ± 5.07 ^a	79.2 ± 8.70 ^a
Natural factor	Fulton	0.17 ± 0.01 ^{b,c}	0.13 ± 0.01 ^{a,c}	0.2 ± 0.01 ^c	0.18 ± 0.01 ^{b,c}	0.16 ± 0.01 ^{a,b}	0.16 ± 0.01 ^{a,b}	0.18 ± 0.01 ^{b,c}	0.14 ± 0.01 ^{a,b,c}	0.14 ± 0.01 ^{a,b,c}	0.13 ± 0.01 ^{b,c}	0.13 ± 0.01 ^{b,c}	0.14 ± 0.01 ^{a,b,c}	0.17 ± 0.01 ^a	0.12 ± 0.01 ^c	0.15 ± 0.01 ^{a,b}	0.12 ± 0.01 ^c	0.12 ± 0.01 ^{b,c}
	HSI	2.40 ± 0.28 ^a	1.64 ± 0.11 ^a	0.93 ± 0.12 ^c	1.11 ± 0.10 ^b	1.04 ± 0.05 ^{b,c}	1.08 ± 0.04 ^b	0.90 ± 0.06 ^c	0.94 ± 0.08 ^{b,c}	0.93 ± 0.15 ^c	0.76 ± 0.07 ^c	1.1 ± 0.19 ^{b,c}	1.34 ± 0.23 ^{ba}	1.07 ± 0.12 ^{a,b,c}	0.72 ± 0.02 ^c	0.91 ± 0.09 ^c	1.01 ± 0.08 ^{b,c}	1.61 ± 0.29 ^a
	Temperature (°C)	17.00	19.10	22.00	12.00	22.20	21.40	21.30	23.00	23.00	23.00	23.00	23.00	23.00	23.00	23.00	23.00	13.00
	Salinity (‰)	1.90	16.50	0.00	0.11	0.32	0.13	7.78	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	18.00	5.00
Metals	Food intake rate (%)	~	~	~	~	~	~	~	71.9 ± 3.33 ^a	68.85 ± 3.4 ^a	43.4 ± 1.91 ^b	76.51 ± 3.30 ^a	82.67 ± 3.73 ^c	94.64 ± 1.85 ^d	32.15 ± 1.73 ^e	27.8 ± 1.16 ^f	56.84 ± 4.99 ^g	39.27 ± 2.32 ^h
	Cd	0.48 ± 0.18 ^{d,e}	2.1 ± 0.51 ^{a,c,d}	0.33 ± 0.07 ^e	4.47 ± 1.64 ^{b,c}	4.52 ± 0.92 ^{a,b}	1.55 ± 0.46 ^{c,d,e}	8.39 ± 0.89 ^a	0.06 ± 0.01 ^a	0.12 ± 0.21 ^a	0.67 ± 0.20 ^b	~	~	~	~	~	~	~
Contaminants	Hg	<LQ	<LQ	1.8 ± 0.23 ^a	<LQ	0.57 ± 0.06 ^b	0.69 ± 0.08 ^b	1.42 ± 0.4 ^{ab}	0.51 ± 0.15 ^a	~	~	2.94 ± 1.10 ^b	~	~	~	~	~	~
	hcb	0.6 ± 0.05 ^c	<LQ	2.23 ± 0.30 ^b	2.08 ± 0.24 ^b	2.26 ± 0.32 ^b	3.27 ± 0.64 ^b	5.78 ± 1.06 ^a	0.89 ± 0.11 ^a	~	~	~	0.99 ± 0.20 ^a	~	~	~	~	~
	Lindane	<LQ	<LQ	ND	<LQ	4.78 ± 1.08 ^{a,b}	6.2 ± 0.75 ^b	0.87 ± 0.05 ^a	<LQ	~	~	~	<LQ	~	~	~	~	~
	2,4'dde	<LQ	<LQ	2.23 ± 0.53 ^b	2.69 ± 1.34 ^b	1.85 ± 0.54 ^b	9.18 ± 6.48 ^a	5.75 ± 1.18 ^a	1.47 ± 0.11	~	~	~	<LQ	~	~	~	~	~
	4,4'dde + dieldrin	6.09 ± 0.62 ^d	<LQ	22.34 ± 2.6 ^c	70.9 ± 17.99 ^b	32.85 ± 7.61 ^{b,c}	134.02 ± 4.77 ^a	168.44 ± 4.03 ^a	2.7 ± 0.32 ^a	~	~	~	6.63 ± 2.10 ^b	~	~	~	~	~
	4,4'DDD	0.28 ± 0.03 ^d	<LQ	1.5 ± 0.3 ^c	9.12 ± 5.0 ^b	3.3 ± 0.83 ^{b,c}	18.76 ± 3.93 ^a	27.48 ± 6.43 ^a	1.44 ± 0.13 ^a	~	~	~	2.05 ± 0.51 ^a	~	~	~	~	~
	2,4'DDT	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	~	~	~	0.42 ± 0.07	~	~	~	~	~
	4,4'DDT	0.61 ± 0.08 ^c	<LQ	0.37 ± 0.02 ^c	2.58 ± 1.14 ^b	2.38 ± 0.37 ^b	4.83 ± 0.08 ^{a,b}	5.96 ± 1.03 ^a	0.37 ± 0.03 ^a	~	~	~	1.53 ± 0.30 ^b	~	~	~	~	~
	OCP_sum	7.41 ± 0.91 ^d	<LQ	28.14 ± 3.44 ^c	86.42 ± 21.81 ^b	46.21 ± 9.45 ^{b,c}	176.27 ± 24.0 ^a	213.93 ± 28.7 ^a	5.67 ± 0.82 ^a	~	~	~	12.26 ± 4.23 ^b	~	~	~	~	~
	pcb_sum	14 ± 4.54 ^d	<LQ	67.64 ± 5.50 ^c	99.2 ± 33.28 ^c	278.65 ± 0.8 ^{b,c}	1587 ± 53.7 ^{a,b}	1712.45 ± 0.24 ^a	92.23 ± 3.83 ^{a,b}	~	~	~	~	68.75 ± 7.60 ^a	170.52 ± 2.67 ^b	~	~	~

Table 3: List of genes commonly found between cold-acclimated fish and animals from wild sites St. Pierre, Dordogne, Garonne and Gironde and their respective fold changes compared to controls. Induction factors are superior to 1 and repression factors are inferior to 1.

Gene name	Biological process	Temperature	St Pierre	Dordogne	Garonne	Gironde
Transcription factor E2-alpha	/	1.56	1.51	1.45	1.45	1.45
Arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein	Regulation of histone deacetylation	1.89	1.84	1.7	1.77	2.09
Krueppel-like factor 12	Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	0.31	0.36	0.47	0.39	0.37
DNA damage-inducible transcript 4-like protein	Negative regulation of signal transduction	1.33	1.66	1.47	1.65	1.56
ATP-binding cassette sub-family D member 4	ATP catabolic process	1.75	1.64	1.8	1.8	1.86
Sortilin-related receptor	Transport	2.27	2.4	1.82	2.27	2.13
Integral membrane protein 2A	/	1.64	2.09	2.11	1.95	1.62
TATA-binding protein-associated factor 2N	Transcription initiation from RNA polymerase II promoter	1.89	1.79	1.96	2.51	2.14
Protein arginine N-methyltransferase 7	Regulation of transcription	1.56	1.85	1.65	1.7	1.61
Complement C3	/	1.72	2.02	1.83	2.15	1.96

Fig 1

1A



1B

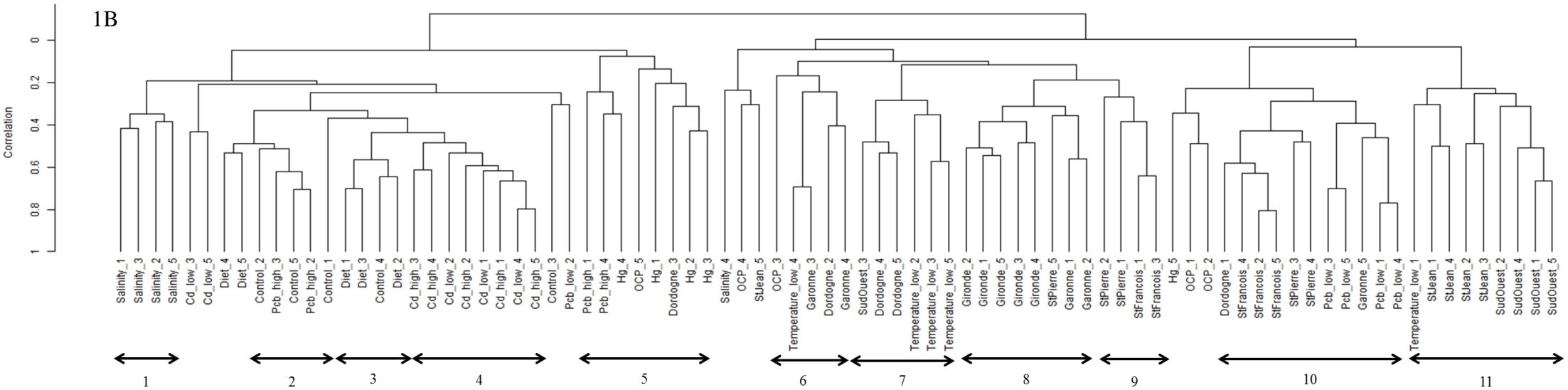
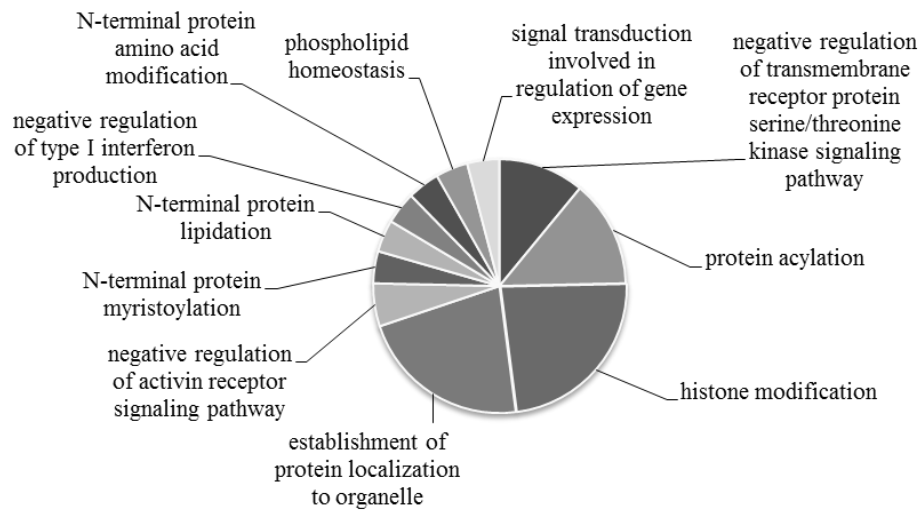
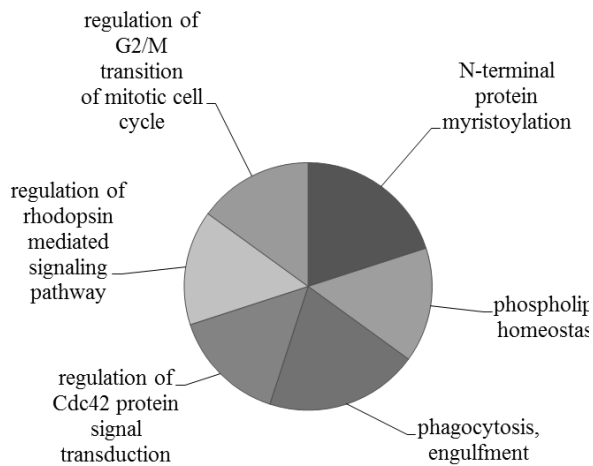


Fig. 2

2A. All gene



2B. Down-regulated gene



2C. Up-regulated gene

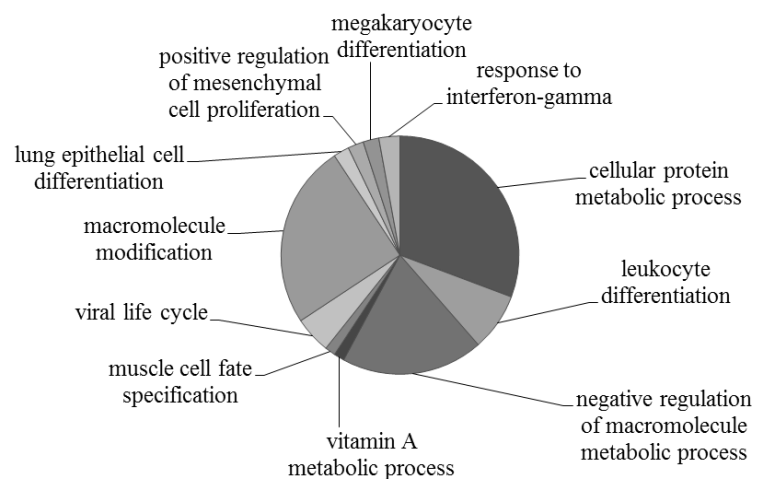
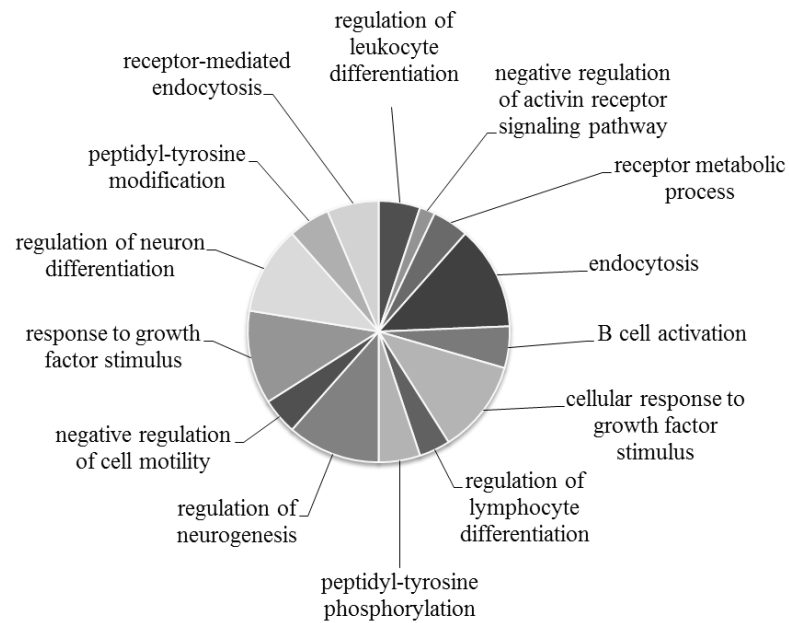
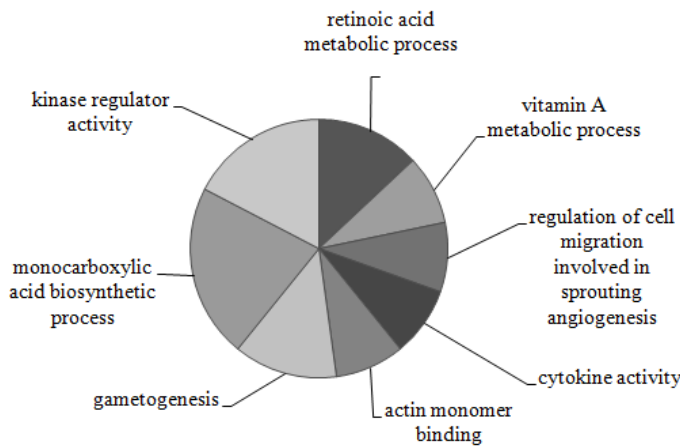


Fig. 3

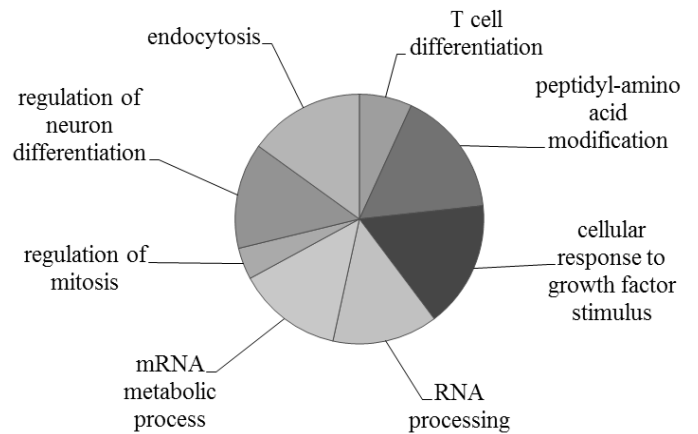
3A. All gene



3B. Down-regulated gene



3C. Up-regulated gene



Reference

- [1] Thrush, S.F.; Hewitt, J.E.; Dayton, P.K.; Coco, G.; Lohrer, A.M.; Norkko, A. Forecasting the limits of resilience: integrating empirical research with theory. *P. Roy. Soc. Lond. B Bio.* **2009**, 276(1671), 3209-17.
- [2] Denslow N, Garcia-Reyero NA, Barber DS. Fish ‘n’ chips: the use of microarrays for aquatic toxicology. *Mol. Biosyst.* **2007**, 3, 172–177.
- [3] Pierron, F. ; Normandeau, E., Defo, M.A. ; Campbell, P.G.C. ; Bernatchez, L. ; Couture, P. Effects of chronic metal exposure on wild fish populations revealed by high-throughput cDNA sequencing. *Ecotoxicology.* **2011**, 20(6), 1388-99.
- [4] Baillon, L.; Pierron, F.; Coudret, R.; Normandeau, E. ; Caron, A. ; Peluhet, L. ; et al. Transcriptome profile analysis reveals specific signatures of pollutants in Atlantic eels. *Ecotoxicology.* **2014**. In press.
- [5] Poynton, H.C.; Loguinov, A.V.; Varshavsky, J.R.; Chan, S.; Perkins, E.J.; Vulpe, C.D. Gene Expression Profiling in *Daphnia magna* Part I: Concentration-Dependent Profiles Provide Support for the No Observed Transcriptional Effect Level. *Environ. Sci. Technol.* **2008a**, 42, 6250–6256.
- [6] Poynton, H.C.; Zuzow, R.; Loguinov, A.V.; Perkins, E.J.; Vulpe, C.D. Gene Expression Profiling in *Daphnia magna*, Part II: Validation of a Copper Specific Gene Expression Signature with Effluent from Two Copper Mines in California. *Environ. Sci. Technol.* **2008b**, 42, 6257-6263.
- [7] Belpaire, C.; Goemans, G. Eels: contaminant cocktails pinpointing environmental contamination. *ICES J. Ma. Sci.* **2007**, 64(7), 1423-1436.
- [8] Geeraerts, C.; Belpaire, C. The effects of contaminants in European eel: a review. *Ecotoxicology* **2010**, 19, 239-266
- [9] Ramaswamy, S.; Tamayo, P.; Rifkin, R.; Mukherjee, S.; Yeang, C.H.; Angelo, M.; Ladd, C.; Reich, M.; Latulippe, E.; Mesirov, J.P.; et al. Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, 98, 15149–15154.
- [10] Tapie, N.; Le Menach, K.; Pasquaud, S.; Elie, P.; Devier, M.H.; Budzinski, H. PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary: From glass eels to silver eels. *Chemosphere.* **2011**, 83, 175-85.
- [11] Dave, G.; Johansson-Sjoberg, M.L.; Larsson, A.; Lewander, K.; Lidman, U. Metabolic and hematological effects of starvation in the European eel, *Anguilla anguilla* L. I. Carbohydrate, lipid, protein and inorganic ion metabolism. *Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol.* 1975, 52A, 423-430.

- [12] Pierron, F. ; Baudrimont, M. ; Bossy, A. ; Bourdineaud, J.P. ; Brèthes, D. ; Elie, P. ; Massabuau, J.C. Impairment of lipid storage by cadmium in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquat. Toxicol.* **2007**, 88, 304-311.
- [13] Simon, R.; Lam, A.; Li, M.C.; Ngan, M.; Menenzes, S. ; Zhao, Y. Analysis of gene expression data using BRB-ArrayTools. *Cancer Inform.* **2007**, 4(3), 11-7.
- [14] Mcshane, L.M.; Radmacher, M.D.; Freidlin, B.; Yu, R.; Li, M.C.; Simon, R. Methods for assessing reproducibility patterns observed in analyses of microarray data. *Bioinformatics.* **2002**, 18: 1462-1469.
- [15] Wright, M.H.; Heal, W.P.; Mann, D.J.M.; Tate E.W. Protein myristoylation in health and disease. *J. Chem. Biol.* **2010**, 3, 19–35.
- [16] Magnadottir, B. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immun.* **2006**, 20, 137-151
- [17] Pickering, A.D. Growth and stress in fish production. *Aquaculture.* **1993**, 111, 51-63.
- [18] Ortuno, J.; Esteban, M.A.; Meseguer, J. Effects of short-term crowding stress on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. *Fish Shellfish Immun.* 2001, 11, 187–197.
- [19] Caldutch-Giner, J.A.; Davey, G.; Saera-Vila, A.; Houeix, B.; Talbot, A.; Prunet, P.; Cairns, M.T.; Pérez-Sánchez, J. Microarray technology to assess the time course of liver stress response after confinement exposure in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L). *BMC Genomics.* 2010, 11,193.
- [20] Beullens, K.; Eding, E. H.; Gilson, P.; Ollevier, F.; Komen, J.; Richter, C.J.J. Gonadal differentiation, intersexuality and sex ratios of European eel (*Anguilla anguilla* L.) maintained in captivity. *Aquaculture.* **1997a**, 153, 1-2.
- [21] Beullens, K.; Eding, E. H.; Gilson, P.; Ollevier, F.; Komen, J.; Richter, C.J.J. Sex differentiation, changes in length, weight and eye size before and after metamorphosis of European eel (*Anguilla anguilla* L.) maintained in captivity. *Aquaculture.* **1997b**, 153,1–2.
- [22] Terova, G.; Cattaneo, A.G.; Preziosa, E.; Bernardini, G.; Saroglia, M. Impact of acute stress on antimicrobial polypeptides mRNA copy number in several tissues of marine sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *BMC Immunology.* **2011**, 12(1), 69.
- [23] Jankowsky, D.; Hotopp, W.; Seibert, W. Influence of thermal acclimation on glucose production and ketogenesis in isolated eel hepatocytes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **1984**, 246 (4), 471- 478.

- [24] Andrews, M.T.; Russeth, K.P.; Drewes, L.R.; Henry, P-G. Adaptive mechanisms regulate preferred utilization of ketones in the heart and brain of a hibernating mammal during arousal from torpor. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2009**, 296, 383–393.
- [25] Suda, T.; Takakura, N.; Oike, Y. Hematopoiesis and angiogenesis. *Int. J. Hematol.* **2000**, 71, 99-107.
- [26] Calgani, E.; Elenkov, I. Stress System Activity, Innate and T Helper Cytokines, and Susceptibility to Immune-Related Diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2006**, 1069, 62–76.
- [27] Johnston, I.A.; Dunn, J. Temperature acclimation and metabolism in ectotherms with particular reference to teleost fish. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **1987**, 41, 67-93.
- [28] Vergauwen, L.; Knapen, D.; Hagenaars, A.; De Boeck, G.; Blust, R. Assessing the impact of thermal acclimation on physiological condition in the zebrafish model. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **2013**, 183(1), 109–121.
- [29] Sidell, B.D. Intracellular oxygen diffusion: The roles of myoglobin and lipid at cold body temperature. *J. Exp. Biol.* **1998**, 201, 1118-1127.
- [30] Gracey, A.Y.; Fraser, E.J.; Li, W.; Fang, Y.; Taylor, R.R.; Rogers, J.; Brass, A.; Cossins, A.R. Coping with cold: An integrative, multitissue analysis of the transcriptome of a poikilothermic vertebrate. *PNAS.* **2004**, 48 (101), 16970–16975
- [31] Boeuf, S.; Borger, M.; Hennig, T.; Winter, A.; Kasten, P.; Richter, W. Enhanced ITM2A expression inhibits chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation.* **2009**, 78, 108–115.
- [32] Zoltewicz, J.S.; Stewart, N.J.; Leung, R.; Peterson, A.S. Atrophin 2 recruits histone deacetylase and is required for the function of multiple signaling centers during mouse embryogenesis. *Development.* **2003**, 131, 3-14.
- [33] Ng, H. H.; Bird, A. Histone deacetylases: silencers for hire. *Trends. Biochem. Sci.* **2000**, 25, 121-126
- [34] Miranda, T.B.; Miranda, M.; Frankel, A. ; Clarke, S. PRMT7 Is a Member of the Protein Arginine Methyltransferase Family with a Distinct Substrate Specificity. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 22902-22907.
- [35] Rajotte, J.W.; Couture, P. Effect of environmental metal contamination on the condition, swimming performance and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **2002**, 59, 1296-1304.

3. Conclusion

L'objectif de ce chapitre était de tester la possibilité d'identifier et de démêler les effets isolés des contaminants lorsqu'ils sont en mélange dans l'environnement au moyen de la puce à ADN. L'objectif sous-jacent était de tester la possibilité de hiérarchiser les effets des contaminants. Dans cette optique nous avons réalisé des expositions en conditions séparées en laboratoire sur des anguilles au stage jaune, le stade somatique où cette dernière va accumuler des graisses mais aussi les contaminants. Les profils transcriptomiques du foie obtenus à partir des individus expérimentaux ont été comparés avec les profils obtenus à partir d'anguilles jaunes prélevées en milieu naturel dans différents sites le long de deux estuaires, le Saint-Laurent au Québec et la Gironde en France. La réalisation d'analyses de regroupement hiérarchique pour classer les profils selon leur ressemblance d'expression génique a permis de s'affranchir de l'hypothèse de l'effet de l'espèce sur les réponses des gènes. En outre, cette classification sous forme de dendrogramme a permis d'observer l'influence non négligeable de l'effet de la captivité en laboratoire puisque les animaux exposés artificiellement étaient clairement séparés du groupe d'individus sauvages. Cela nous a amené à explorer les gènes qui différenciaient ces deux groupes et à comprendre les possibles effets liés au confinement en laboratoire, souvent décrits dans la littérature pour la production en aquaculture. Les processus biologiques les plus représentés parmi les 192 gènes différentiellement exprimés entre ces deux groupes (laboratoire et terrain), correspondent au système immunitaire de même que la régulation du cycle cellulaire, indiquant un possible arrêt de croissance chez les animaux maintenus en captivité. La transcription enfin de gènes impliqués dans des mécanismes épigénétiques suggérerait une stratégie différente d'adaptation de l'organisme suite à une exposition à un stress anthropique à court ou long terme.

De façon surprenante, nos résultats ont montré cependant un lien entre les profils transcriptomiques obtenus chez des poissons exposés en laboratoire à une faible température et des poissons échantillonnés dans des sites pollués, tels que la Dordogne, la Garonne, la Gironde et Saint-Pierre. L'établissement de la « signature » d'une exposition à une température froide (13°C contre 23°C pour les témoins) a permis de mettre en lumière un possible changement du métabolisme énergétique basal. En effet, outre la stimulation de la mitose et la baisse probable du système immunitaire, il semblerait qu'à faible température, l'activité mitochondriale soit altérée. En accord avec la littérature, une exposition à une faible température entraînerait une augmentation du nombre de cellules hépatiques pour compenser

la baisse de cette activité. La similarité des profils des animaux sauvages exposés de façon chronique à une contamination multiple avec ceux exposés à une faible température pourrait souligner qu'une exposition à long terme à des contaminants entraînerait un profond changement du métabolisme basal pour assurer la survie des animaux. Les gènes retrouvés communément surexprimés entre la condition expérimentale et les sites contaminés étaient en outre impliqués dans des mécanismes épigénétiques. Ces résultats ont mis en évidence un possible changement global de l'expression des gènes via la modification de la structure même de l'ADN dans le but de survivre à une exposition à long terme à des contaminants quelle qu'en soit la nature.

Nous avons ainsi mis en évidence dans ce chapitre que les réponses des organismes et les stratégies de défense face à une contamination peuvent être très différentes à court et long terme, particulièrement au niveau des mécanismes épigénétiques et du métabolisme énergétique. Si le foie est un organe de choix en écotoxicologie pour comprendre les mécanismes affectés par la contamination, cette méthode d'investigation reste cependant invasive et problématique quand l'étude se réalise sur des espèces en danger d'extinction. Au cours du prochain chapitre nous allons tenter de répondre à cette problématique en testant la nageoire caudale et sa capacité de réponse à la contamination.

Chapitre 5

*Application de la puce à ADN à une méthode non-
invasive : comparaison des réponses
transcriptomiques de la nageoire
in situ et en laboratoire*

1. Introduction

Si au cours du chapitre précédent nous avons tenté d'établir un lien entre individus exposés en laboratoire et des individus prélevés *in situ* à partir d'échantillons de foie, dans le contexte d'espèces considérées en danger d'extinction, le test d'une méthode non-invasive s'est alors imposé. Le foie est largement utilisé en écotoxicologie du fait de son statut de « carrefour » de nombreuses voies métaboliques et est connu pour être un bon accumulateur de contaminants tant métalliques qu'organiques (Gül et al., 2004; Gonzales et al., 2006; Van Dyk et al., 2007). L'utilisation de cet organe cible des contaminants a ainsi été privilégiée dans le but de comprendre les effets des contaminants sur l'organisme entier. Cependant, l'utilisation du foie implique le sacrifice des organismes et demeure ainsi délicate dans le cas d'espèces dont les populations s'effondrent dramatiquement. Le choix d'une méthode non-invasive s'est alors porté sur la nageoire. En effet, les poissons vertébrés ont une capacité de régénération épimorphique, c'est-à-dire, de régénérer un tissu endommagé comme le cœur, le muscle ou les nageoires. Le développement de méthodes non-invasives en écotoxicologie moléculaire a été réalisé récemment sur la truite arc-en-ciel (Veldhoen et al., 2013). Ces auteurs, dans le but d'investiguer la capacité de la nageoire caudale à « répondre » à une exposition à des contaminants, ont exposé des truites arc-en-ciel au cadmium et à un perturbateur endocrinien, le 17 α -ethinyl estradiol. Un nombre limité de gènes, connus pour changer d'expression en présence de ces deux composés, ont été testés d'abord sur le foie, l'organe de référence et sur la nageoire caudale des individus. La « réponse » de ce tissu, illustrée par le changement d'expression de gènes entre les individus témoins et contaminés au niveau du foie et de la nageoire caudale a montré la pertinence de l'utilisation de cet organe pour les études écotoxicologiques.

Au cours de ce chapitre, nous allons tenter de répondre à la question suivante : *Peut-on séparer et hiérarchiser les effets des contaminants sur le terrain à partir d'expositions en laboratoire en utilisant une méthode non-invasive ?* Cette interrogation a été abordée à l'aide de la puce ADN appliquée à la nageoire caudale d'individus exposés en laboratoire et d'individus issus de différents sites situés en France. La comparaison des profils d'expression de gènes établis à partir de la nageoire et du foie d'individus exposés au cadmium en laboratoire ont également été comparés dans le but de valider d'une part la pertinence de la nageoire à « répondre » à la contamination et d'une autre part, dans le but d'identifier une signature transcriptomique du cadmium, commune aux deux organes.

2. Article

Title: Detecting the exposure to Cd and PCBs by means of a non-invasive transcriptomic approach in laboratory- and wild-contaminated European eels (*Anguilla Anguilla*).

Authors : Lucie Baillon^{1,2}, Fabien Pierron^{1,2*}, Jennifer Oses^{1,2}, Pauline Pannetier³, Eric Normandeau⁴, Patrice Couture³, Pierre Labadie^{1,2}, Hélène Budzinski^{1,2}, Patrick Lambert⁵, Louis Bernatchez⁴, Magalie Baudrimont^{1,2}

¹Univ. Bordeaux, UMR EPOC CNRS 5805, F-33400 Talence, France

²CNRS, EPOC, UMR 5805, F-33400 Talence, France

³Institut National de la Recherche Scientifique, Centre Eau Terre Environnement, 490 de la Couronne, Québec (Québec) G1K 9A9 Canada

⁴Département de biologie, Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS), Université Laval, Québec (Québec) G1V 0A6 Canada

⁵Irtsea, UR EABX, 50 avenue de Verdun-Gazinet, 33612 Cestas, France

*Corresponding author: Fabien Pierron

f.pierron@epoc.u-bordeaux1.fr Tel: +33 556 223 927 FAX: +33 540 708 504

Soumis à Ecotoxicology and Environmental Safety

Abstract

Detecting and separating specific effects of contaminants in a multi-stress field context remain a major challenge in ecotoxicology. The aim of this study was to apply a previously developed cDNA microarray comprising 1000 candidate genes on caudal fin clips in order to assess the usefulness of a non-invasive method in ecotoxicogenomic studies in the European eel. Fin gene transcription patterns of eels exposed in the laboratory to Cd or a PCBs mixture but also of wild eels from 3 sampling sites with differing contamination levels were compared to test whether fin clips may be used to detect and discriminate the exposure to these contaminants. Also, transcriptomic profiles from liver and caudal fin of eels experimentally exposed to Cd were compared to assess the detection sensitivity of the fin transcriptomic response. Our results showed distinct fin transcription profiles in response to Cd or PCBs exposure. In addition, the transcription profiles of eels from the most contaminated site clustered with the laboratory-exposed fish. Finally, a similar number of genes was differentially transcribed in fin and liver in response to Cd exposure. Among the genes that were commonly affected in fin and liver in response to Cd exposure, many of them were found to be involved in tissue development and in epigenetic mechanisms. This study thus highlights the applicability and usefulness of performing gene transcription assays on non-invasive tissue sampling in order to detect the *in situ* exposure to Cd and PCBs in fish.

Keywords: cDNA microarray, multi-pollutant, European eel, ecotoxicology, transcriptomics, non-invasive sampling.

1. Introduction

Aquatic ecosystems are complex and dynamic entities which structure, composition and function change on a daily and seasonal basis in response to variations in natural factors. In addition, ecosystems are increasingly subjected to anthropogenic disturbances such as global climate change or contaminants (Thrush et al. 2009). The goal of ecotoxicology is to assess and predict the impact of contaminants on organisms, populations and ecosystems. A huge challenge for ecotoxicologists is thus to distinguish the effects triggered by contaminants from those triggered by natural factors. It is even more difficult to detect and assess the contribution of individual contaminants in a multi-pollutant field context (Denslow et al. 2007).

In this context, particular emphasis was placed in recent years on the potential use of transcriptomics in ecotoxicology. By allowing wide-ranging approaches, transcriptomic investigations could potentially allow to discover new mechanisms of toxicity and separate the *in situ* effects triggered by man-induced stressors *versus* natural factors (Denslow et al. 2007). Indeed, past studies indicated that model ecotoxicological organisms experimentally exposed to contaminants produce a distinctive pattern of gene transcription for each contaminant (Denslow et al. 2007; Poynton et al. 2008a,b).

Atlantic eels are catadromous fish species with a complex life cycle including marine (sexual maturation, spawning and larval phase) and continental (feeding and growth) environments. Historically abundant and widespread in Europe and North America, populations of Atlantic eels have suffered a sharp decline (Haro et al. 2000; Wirth and Bernatchez 2003; Geeraerts and Belpaire, 2010; de Lafontaine et al. 2010). The European species is currently considered as critically endangered of extinction by the International Union for Conservation of Nature. The American eel was recently designated as threatened by the Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Among hypotheses advanced to explain these declines, the possible contribution of pollution has received considerable attention in recent years. The unusual life cycle of Atlantic eels makes them particularly vulnerable to pollution (Belpaire and Goemans, 2007; Geeraerts and Belpaire, 2010). For these reasons, Atlantic eels could be considered as a sentinel species in ecotoxicology and as a model to explore recent hypotheses for which human activities have led to a tremendous decrease in aquatic biodiversity in the last century.

In a previous study (Baillon et al., 2015), we used RNA-Seq technology on these two threatened species. A main objective of that previous study was to discover without any *a priori* statistically confident “candidate genes” that are more likely related to contaminant

exposure than to natural stressors. To do this, an RNA-Seq study was carried out on wild eels from 8 sampling sites presenting a broad contamination gradient. Among the 11,547 unique genes of known function identified, 1000 candidate genes for which transcription levels were found to be significantly correlated (FAMT analysis; Friguet et al., 2009) with a particular contaminant (10 metals and 25 organic contaminants) or natural factor (temperature, salinity) were selected to build the cDNA microarray.

Due to the critically endangered status of the European eel species, the objective of this study was to test whether the caudal fin may be used to detect *in situ* exposure to contaminants by means of a cDNA microarray. Indeed, teleost fish fin can regenerate within a few weeks after amputation (Poss et al. 2003, Schebesta et al. 2006) and the use and development of non-invasive methods in ecotoxicology appear to be highly relevant, especially for endangered species. Veldhoen and colleagues (2013) have already shown the potential of the caudal fin in ecotoxicological studies with rainbow trout. In their study, fish were exposed to cadmium (Cd) during 96h and the transcription level of genes encoding for the metallothionein isoforms A and B, catalase and aryl hydrocarbon receptor was analyzed by means of quantitative PCR analysis. Since significant changes in gene transcription levels were observed in their study, it appears interesting to further explore these findings and to investigate the transcriptomic response of the fin in animals exposed for longer periods in the laboratory as well as in wild animals, to test whether the fin may be used to detect the effects of contaminants in wild contaminated fish.

In the present study, wild immature European yellow eels were captured along the hydrosystem Garonne–Gironde fluvio-estuary system (France) known to be polluted by Cd and polychloro-biphenyls (PCBs) notably (Durrieu et al. 2005; Tapie et al. 2011). In addition, control individuals were captured in a clean site (Certes). For controlled laboratory exposures, eels were taken from the clean site (Certes) and were exposed during 45 days either to Cd or to a mixture of PCBs in order to mimic field exposure conditions. Finally, in order to assess the detection sensitivity of the fin, the transcription profile from caudal fin and liver of experimentally Cd-contaminated fish were compared. The liver was selected due to its wide range of functions, including metal detoxification and energy metabolism but also because (i) it represents an organ extensively studied in toxicology and (ii) it is a main site of Cd bioaccumulation and toxicity in fish (Gül et al. 2004; Gonzalez et al. 2006; van Dyk et al. 2007).

2. Materials and methods

2.1 Microarray construction

2.1.1. Candidate-gene selection and identification

The hepatic transcriptome of 48 wild eels, collected in 8 sites (4 Canadian and 4 French sites; 6 fish per site) presenting a contamination gradient and a wide range of physicochemical conditions, was determined by high throughput RNA sequencing using Illumina Hiseq2000 technology (Baillon et al., 2015). A total of 11,547 unique genes of known function were identified. In parallel, the contamination level of fish in 8 metals and 25 organic contaminants was determined and the temperature, salinity and dissolved oxygen concentration were measured in each sampling site. Then, we carried out correlation analyses between the transcriptional level of a given gene and (i) contaminant concentrations in each individual fish, (ii) condition indices, and (iii) physicochemical characteristics of sampling sites by means of the factor analysis for multiple testing (FAMT) method (Friguet et al. 2009). The FAMT model was used with a unique threshold of 0.003 in order to identify genes which transcription levels were more significantly correlated with a single natural or anthropogenic factor. Details about the FAMT model are available in the supplementary material.

In total, 61 genes were significantly correlated with Ag, 64 with As, 60 with Cd, 64 with DDT, 49 with HCB, 55 with Hg, 35 with PBDE-47, 51 with PCB-sum, 68 with trans-nonachlor, 115 with lindane, 51 with hepatosomatic index (HSI), 18 with the Fulton condition factor (K), 68 with spleen-somatic index (SSI), 91 with salinity and 84 with sampling site temperature. To reach a total of 1000 candidate genes, 66 genes which transcription levels were significantly correlated with two factors were retained. One thousand oligonucleotide probes (60 mers) were designed using the command line version of ProDesign (Feng and Tillier, 2007) and synthesized by Eurofin®. In order to minimize cross hybridization, probes were designed only from contigs that showed a high homology with known sequences (BLASTX, Evalue < 10^{-30}). Such a strategy allowed removing the contigs that could be improperly assembled. In addition, sequences were trimmed and each probe was designed from the part of the contig that shows a high homology with known sequences. The ProDesign maximizes probe specificity and ensures that no probe can be found within the list of interesting genes, or in the list of unwanted sequences. Thus, all the contigs determined from our previous work (Baillon et al., 2015), i.e. 18,115 contigs, were used to maximize

probe specificity. All probes were dried and stocked in 384-well plates. Details about microarray platform have been deposited with the NCBI/ Gene Expression Omnibus (GEO) under the accession number GPL19017.

2.1.2. Microarray printing

The probes were re-suspended in 3X SSC buffer and printed on Corning® UltraGAPS™ Coated Slides with the Q-array Mini (Genetix) at the “Génome et Transcriptome” (GeT) microarray platform (Toulouse, France). SPM3 (Telechem) Microarray Printing Pins were used to deposit 2nl per spot (100µm/spot) onto the slide.

The probes were then crosslinked with UV irradiation. The microarray layout consists of a 4-by-4 metagrid with 11 x 18 spots in the subgrids. Each line (a total of 4 lines) of 4 subgrids was separated by a line labeled spots in Cy3 and itself separated by 5 lines of non-labeled spots. Each probe was triplicated on the microarray, improving the robustness and repeatability of the measurements. The 1000 probes were deposited in a 4 x 4 metagrid.

2.2. Wild eel sample collection

Immature yellow eels (*Anguilla Anguilla*) were collected in two contaminated sites along the Gironde aquatic system (Garonne: 45°12'06.62"N 0°43'34.72"O and Gironde estuary: 45°12'06.62"N 0°43'34.72"O), and in the Arcachon Bay, considered as a clean environment (Certes: 44°41'18"N 1°1'39"W). Temperature reached 21.4, 21.3 and 21.9°C and salinity was 0.13, 7.78 and 19.9‰ for Garonne, Gironde and Certes, respectively.

All fish were collected between May 24 and June 24, 2011, using a trawl or a fyke net. All immature yellow eels were size selected to minimize potential allometric bias (length = 48.2 ± 2.7 cm, weight = 225 ± 42.9 g, mean \pm SE, n = 15). For each sampling site, a total of 5 fish were collected and used for subsequent analyses. Fish were dissected as soon as possible and organs were divided into several samples. Samples for gene transcription analyses were stored in RNAlater at -20°C until needed. For both organic and metal analyses, samples were stored at -80°C.

2.3. Experimental design for laboratory exposures

All procedures used in this experiment were approved by the Aquitaine fish-birds ethics committee. Immature yellow eels (*Anguilla anguilla*), averaging 37 cm in length and 70 g in weight (36.9 ± 2.5 cm and 70.4 ± 2.4 g, respectively, mean \pm SE, $n = 32$) were captured in Certes in May 2012. The animals were transferred to the laboratory (Marine Biology Station of Arcachon) and kept in running aerated brackish water (salinity 5‰, natural seawater dilution with aerated tap water) thermostated at 23°C over a 1-month acclimation period, prior to experimentation. During this period, fish were fed every day with blue mussels, and no lethality was observed.

Laboratory exposures were performed in a flow-through system consisting of three separate 215 L experimental units (EU). Each tank was supplied with brackish water (salinity = 5‰) by four water flow-meters and contained eight organisms per tank. Contaminant exposure was initiated after one month of adaptation to the experimental conditions. During the experiment (45 days), eels were fed every two days *ad libitum* (7.5% wet weight of food per wet weight of fish per day) with artificial food (fresh fish flesh mixed with oil (1.3%) and agar-agar (0.8%)). For PCBs, the trophic route is known to be the major contamination route in fish (Loizeau and Menesguen, 1993). In addition, in order to be closed to *in situ* conditions, PCBs concentrations used in our experiments were based on the levels found in prey of eels inhabiting the Gironde estuary (Tapie et al. 2011). For PCBs exposure, this food was enriched in pyralene to reach concentrations of $50 \text{ ng.g}^{-1} \text{ dw}$ and $300 \text{ ng.g}^{-1} \text{ dw}$. The pyralene solution consisted of a mixture of PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180, the seven priority PCBs (US-EPA). For Cd exposure, animals were exposed to dissolved metal at a nominal concentration of $4 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$. Metal exposure was initiated by adding Cd as CdCl_2 from a stock solution in water. To maintain constant Cd contamination over time, contaminated tanks were fitted with a peristaltic pump which added Cd at the desired concentration. Due to technical limitations, the contamination level of Cd used in our experiment was higher than the concentration of dissolved Cd determined in the Gironde estuary ($\text{Cd} \sim 0.1 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$; Masson et al. 2006). Then, the average Cd concentrations were $0.09 \pm 0.01 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ and $4.00 \pm 0.18 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ (mean \pm SE, $n = 12$) in control and contaminated tanks, respectively. Control animals were maintained in uncontaminated brackish water and fed with uncontaminated artificial food. During the exposure, the unconsumed food was removed every morning, dried and weighed. For each UE, the dry weight of unconsumed food was subtracted from the total dry weight of given food to determine the percentage of food consumed, i.e. the food intake rate. Results are expressed as mean \pm SE ($n = 22$). At the end of the exposure period, 5 eels per EU were removed and dissected. Samples of liver and caudal fin were immediately fixed in RNAlater

solution and stored at -20°C until needed for analyses. For both organic and metal analyses, samples were stored at -80°C .

2.4 RNA extraction, labeling and cDNA hybridization

Total RNA was extracted from caudal and liver of the 20 experimental fish (5 individuals per condition; 5 uncontaminated (controls); 5 contaminated by PCBs at 50 ng.g^{-1} and 300 ng.g^{-1} and 5 contaminated by Cd at $4\mu\text{g.L}^{-1}$) and a total of 15 wild fish from Certes, Gironde and Garonne sampling sites (5 specimen per sampling site). RNAs were extracted from 15-25 mg of tissue using the SV total RNA isolation system (Promega) with minor modifications. Then, we used an indirect cDNA labelling method. During the first step, $15\text{ }\mu\text{g}$ of total RNA was reverse transcribed with oligo-dT priming and amino-allyl-dUTP (Sigma). After RT reaction, cDNA purification was made with Qiagen PCR purification kit following the manufacturer's protocol. Purified cDNA were then labeled with CyDye™ Post-Labeling Reactive Dye Pack (Cyanine 3 for sample and Cyanine 5 for reference). In order to normalize microarray data, we used a common reference design. The reference was composed by pooling total RNA from liver of 30 wild eels from the clean site; i.e. Certes (15 fish collected in 2011 and 15 in 2012). This reference was combined in equal amounts with each sample before hybridization on the microarray slide (15 hours at 55°C). A total of 40 microarrays were used as follows: 5 microarrays for the control condition, 10 for the Cd condition (5 for fin and 5 for liver), 5 for each PCB condition (i.e. 50 ng.g^{-1} and 300 ng.g^{-1}), and 5 for each sampling site (i.e. Certes, Gironde and Garonne). Each sample was hybridized once on cDNA microarray. Data acquisition was carried out by means of the Innoscan 710 microarray scanner (Innopsys) using Mapix software. More details on sample preparation and microarray processing are available in NCBI/ Gene Expression Omnibus (GEO) under the accession number GPL19017.

2.5 Metal and organic concentration analyses

For the laboratory Cd exposure, analyses were performed on water and liver samples following the procedures described by Pierron et al. (2007). The detection limit was $0.1\text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ Cd. Metal concentrations in liver were expressed as $\mu\text{g.g}^{-1}$ of dry weight tissue (dw).

For Cd analyses in wild yellow eels, analyses were performed as follow. Liver samples were freeze-dried in PFA vials (Savillex) and kept in these vials during the whole digestion

process. Samples were digested overnight at room temperature in pure trace metal grade nitric acid (HNO₃). The following day, sample digestion was completed by autoclave for 2 hours at 15 PSI. Samples were then diluted in Milli-Q water to obtain a final concentration of 10% HNO₃. Metal concentrations were measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS; Thermo Scientific XSeries 2). Blanks and standards (TORT-2 and DOLT-4, National Research Council Canada) were submitted to the same digestion protocol as liver samples to monitor the efficiency of the procedure. Recovery rate (expressed as % of certified values) was $102.9 \pm 1.2\%$.

Analysis of the seven indicator PCBs (CB50+28, CB52, CB101, CB118, CB138, CB153, and CB180), for wild and experimental animals, were performed on muscle samples following the procedures described by Tapie et al. (2008, 2011). PCBs analyses were carried out on an HP 5890 series II gas chromatograph from Hewlett-Packard (Avondale, CA, USA) coupled to a ⁶³Ni electron capture detector (ECD). A capillary column HP5-MS (Agilent Technologies, Massy, France) was used (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). For PCBs, LoQs were comprised between 0.2 ng.g⁻¹ dw and 2 ng.g⁻¹ dw.

2.6 Data acquisition and analysis

Concerning contaminant analyses, comparisons among fish groups were performed by analysis of variance (ANOVA), after checking assumptions of normality and homoscedasticity of the error terms. The Least Square Deviation test (LSD) was used to determine whether means between pairs of samples were significantly different from one another. Computations were performed using the statistical software Sigma Stat.

Concerning microarrays, the filtering of raw data was done for both green and red channels. The median foreground (F635median and F532median) and median background (B635median and B532median) were used. If the ratio Fmedian/Bmedian was lower than 1.5, data were removed from the analysis. In addition, data from bad replicates spots (three spots for each probe) were excluded from the data set. (For each spot, the background was removed of the foreground and the mean of triplicates was then calculated. Finally, both green and red channels were used for data normalization. Normalization and statistical analysis were done by using the BRB-arrayTools version 4.4.0 software package (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>). Each array was median-normalized over entire arrays and genes were excluded if 50% of values were missing in the complete set of arrays (microarray data have been deposited with the NCBI/Gene Expression Omnibus (GEO) under accession number

GSE62954). In order to detect differences in transcription profiles among the conditions, data were analyzed by means of the class comparison test available in the BRB software which is similar to the Statistical Analysis of Microarrays (SAM) method but provides greater probabilistic control of the false discovery rate. In addition, cluster analyses were conducted on normalized microarray data to search for natural groupings in the profiles. For clustering analyses, an average linkage hierarchical clustering was done with centered correlation using all arrays. Cluster significance and robustness of the dendrogram were examined by the method of Mcshane et al. (2002) based on 1000 permutations.

3. Results and discussion

3.1. Level of contamination

Concerning experimental investigations, a significant bioaccumulation of Cd was observed after 45 days of experimental exposure to dissolved Cd at $4\mu\text{gL}^{-1}$. Eels experimentally exposed to Cd presented a significantly higher hepatic concentration of Cd than controls (Fig. 1A). Surprisingly, even if eels fed with PCBs-contaminated food at 50 ng.g^{-1} were fed with a food 6 times less contaminated than eels fed with PCBs-contaminated food at 300 ng.g^{-1} , the concentration of PCBs in muscle of fish exposed to the lowest concentration was significantly 2.7-times higher than in eels exposed to the highest concentration of exposure (Fig. 1B).

To clarify the discussion, throughout the manuscript, experimental conditions were named accordingly to the concentrations of PCBs determined in the animals. Then, PCB_170 refers to animals that were fed with a food contaminated in PCBs at a nominal concentration of at 50 ng.g^{-1} and PCB_69 to animals that were fed with a food contaminated at 300 ng.g^{-1} . The higher bioaccumulation observed in fish fed with the lowest contaminated food could be explained by the low food intake rate of animals exposed to PCB_69 (Fig. 2). Indeed, for the PCB_69 condition, eels ate significantly less food in comparison to controls and fish of the PCB_170 condition (Fig. 2). As PCBs contamination was carried out by the trophic route, it likely explains the low level of PCBs in eels exposed to the highest contamination pressure.

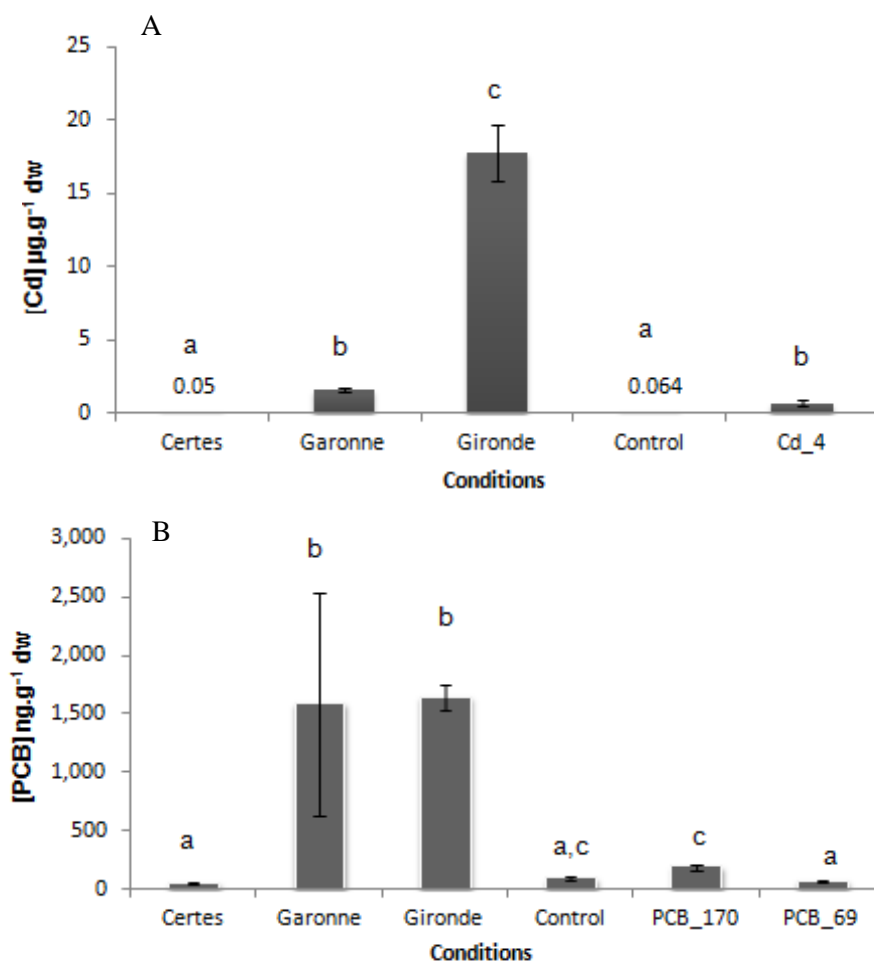


Fig.1 Mean hepatic Cd ($\mu\text{g.g}^{-1}$, dw) (A) and muscle PCBs (ng.g^{-1} , dw) (B) concentrations in controls, in fish experimentally exposed to dissolved Cd at $4 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Cd_4) or to PCBs-contaminated food at two concentrations (PCB_170, PCB_69 for 50 ng.g^{-1} and 300 ng.g^{-1} , respectively) and in wild animals (Certes, Garonne, Gironde). Results are expressed as mean \pm SE ($n=5$). Means designated with different letters are significantly different (LSD test, $P < 0.05$).

Moreover, we must note that in term of PCBs bioaccumulation in fish muscle no significant difference was observed between controls and fish exposed to PCB_170 (Fig. 2). However, the amount of PCBs was twice as high in fish exposed to PCB_170 in comparison to controls. Concerning *in situ* investigations, wild eels from Gironde were significantly more contaminated by Cd than fish from Certes and Garonne (Fig. 1A). For PCBs, fish from Garonne and Gironde appeared to be significantly more contaminated than fish from Certes (Fig. 1B), confirming that Certes was a good reference site in term of contamination. However, we observed a high variability in PCBs concentrations in eels from Garonne with contamination levels ranging from 56 to 5342 ng.g^{-1} with a median value reaching 952 ng.g^{-1} (mean = 1587 ng.g^{-1}). For comparison, contamination levels in eels from Gironde ranged from 1454 to 2052 ng.g^{-1} with a median value reaching 1611 ng.g^{-1} (mean = 1641 ng.g^{-1}).

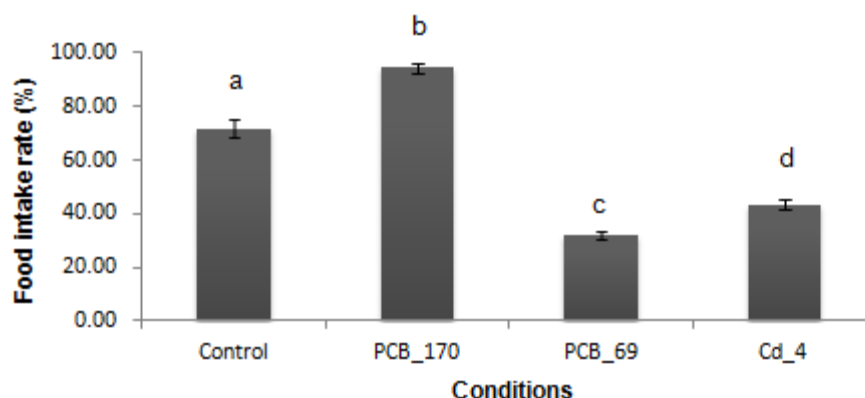


Fig.2 Food intake rate of controls and fish experimentally exposed to Cd (Cd_4) or to PCBs-contaminated food at two concentrations (PCB_170, PCB_69 for 50 ng.g⁻¹ and 300 ng.g⁻¹, respectively). Results are expressed as mean percentage \pm SE (n=22 per condition). Means designated with different letters are significantly different (LSD test, $P < 0.05$).

The comparisons between contamination levels of wild and laboratory eels showed that Certes and control eels presented similar values for both Cd and PCBs. This is in agreement to the fact that control eels were initially sampled in the Certes site. For Cd, wild eels from Garonne and the experimental Cd_4 condition did not differ significantly. However, wild fish from Gironde showed significantly higher contamination levels in both Cd and PCBs in comparison to fish from the experimental exposure conditions. The fact that the concentrations in PCBs and Cd in eels experimentally exposed during 45 days to PCBs and Cd were significantly lower than in wild eels, tend to show that a 45 days period of experimental exposure was not sufficient to mimic several years of chronic exposure.

3.2. Fin transcriptomic responses

3.2.1 Fin transcriptomic response to experimental Cd and PCBs exposures

In order to test if caudal fin clips could be used to detect recent exposure to a particular contaminant, statistical analyses were carried out to identify the genes that were differentially transcribed among experimental exposure conditions, i.e. Cd_4, PCB_69 and PCB_170, and controls. The Venn diagram (Fig. 3) presents the overlap of differentially transcribed genes for the three experimental conditions. The differentially transcribed genes were distributed as follows: 40 genes were only affected by Cd, 75 by PCB_170 and 11 by PCB_69. The corresponding gene lists for Cd_4, PCB_170 and PCB_69 are described in supplementary

material (Table S1, S2 and S3). The transcription level of several genes was modified by two conditions. Specifically, 21 genes were significantly affected in both Cd_4 and PCB_170 conditions, 5 genes were significantly affected by both Cd_4 and PCB_69 and 4 genes were significantly affected by both PCB_170 and PCB_69. The transcription level of only 6 genes was affected by all three experimental conditions.

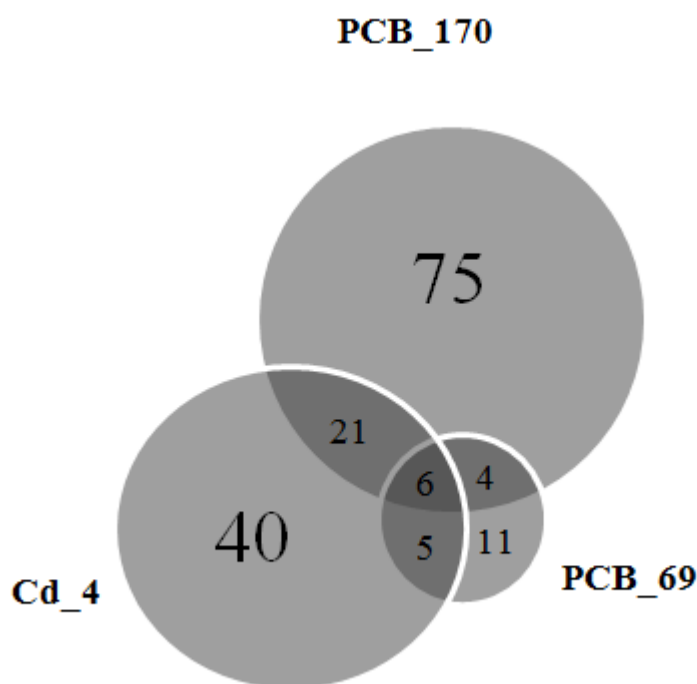


Fig. 3: Venn diagram presenting the number of differentially transcribed genes among fish experimentally exposed to PCB_170 (food at 50 ng.g⁻¹), PCB_69 (food at 300 ng.g⁻¹), and Cd_4 (dissolved metal at 4 µg.L⁻¹). Intersection regions correspond to differentially transcribed genes that were common among the experiments.

Thus, most of the differentially transcribed genes were different from one experimental condition to another. The number of genes differentially transcribed in response to PCBs exposure was higher in fish from the PCB_170 condition in comparison to fish of the PCB_69 condition, i.e. the response was higher in fish exposed to the lower concentration of exposure. As evoked earlier, this can be explained by the fact that eels exposed to the PCB_69 condition were significantly less contaminated than fish exposed to PCB_170. These results suggest that the fin transcriptome could be used not only to detect but also to assess the effects of contaminants. The mechanisms by which contaminants can affect the fin transcriptome remain to be elucidated. We must note that in the particular case of Cd, in addition to internal

redistribution, a direct effect of the metal on the caudal fin cannot be ruled out as the contamination was carried out by the direct route (i.e. dissolved metal in water).

3.2.2 Comparison of the transcriptomic profiles obtained from the fin of wild and laboratory-exposed fish

As caudal fin seemed to show a great potential to detect and discriminate exposure to contaminants during experimental investigations, it was interesting to test whether the fin can be used to detect and separate the specific effects of contaminants on the transcriptome of wild animals. After performing microarray hybridizations, a hierarchical clustering was performed with data obtained from both experimental and wild eels to assess the similarities and dissimilarities among the transcription profiles. First, the dendrogram generated from this analysis (Fig. 4) was divided into 4 clusters with reproducibility indices for the 4 groups reaching 0.808, 0.964, 1 and 0.671, respectively (R-index = 0.876 and D-index = 2.57), which indicates reasonably robust clusters (Mc Shane et al. 2002).

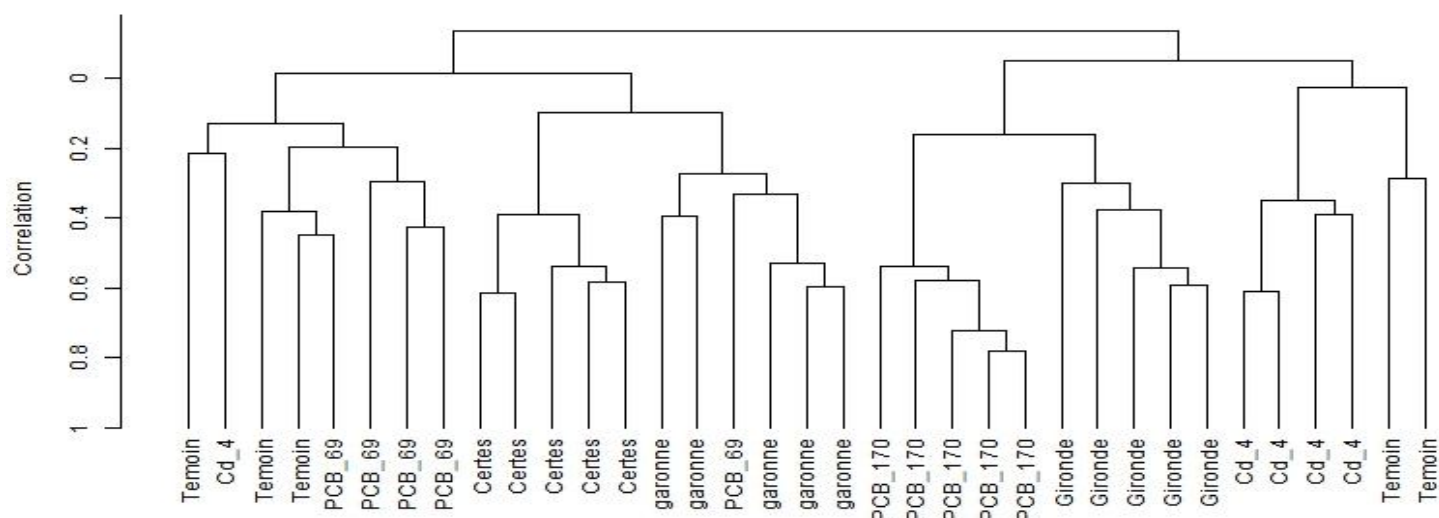


Fig.4 Hierarchical clustering of fin transcriptomic profiles of controls (Ctl), fish experimentally exposed to dissolved Cd at 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cd_4) or PCBs-contaminated food at two concentrations (PCB_170, PCB_69 for 50 ng.g^{-1} and 300 ng.g^{-1} , respectively) and wild eels (Certes; Garonne; Gironde). Clustering was performed using the entire set of genes using the BRB Array tools software and based on means of average linkage clustering and centered correlation.

The first cluster included only laboratory conditions; 3 control fish, 4 PCB_69 and one eel of the Cd_4 condition. The second one included eels from Certes and Garonne and one fish from

PCB_69 condition. The third one included all eels of the PCB_170 condition and all eels from Gironde. The fourth one included 4 fish experimentally exposed to Cd (Cd_4) and 2 control organisms (Fig. 4). Even if 4 animals were not clustered within their respective condition (one Cd_4, two controls and one PCB_69), caudal fin seemed to be able to discriminate the transcriptome profiles of fish from each *in situ* and laboratory condition.

Concerning controls, they were not grouped together but associated with PCB_69 (cluster 1) and animals from Cd_4 condition (cluster 4). This can be explained by a high inter-individual variability of uncontaminated animals. As described by Devin et al. (2014), sublethal exposure to contaminant can lead to a decrease in inter-individual variability and to a canalization of the response to the most efficient one in animals presenting a high phenotypic variability. European eel is indeed a panmictic species that exhibits extreme inter-individual phenotypic variance among teleost fish (Pujolar et al. 2014). In addition, the fact that controls were associated with fish from the PCB_69 condition in the cluster 1 could be explained by the amount of PCB accumulated in the muscle of fish from the PCB_69 condition (discussed earlier). Concentrations of PCBs in these fish were closed to controls and then PCB_69 and control fish showed some similar transcriptomic patterns (only 26 genes were differentially transcribed between controls and PCB_69, Fig. 3 and Table S2). Concerning the transcriptomic profile differences observed between controls and wild animals from Certes (cluster 1 and 2), although all of these animals came from the Certes site, they were not grouped together. This could be explained by experimental conditions. For example, animals were maintained in the laboratory at a lower salinity (5‰ versus 19.9‰ in the Certes site) and eels were fed *ad libitum*. Also the confinement of wild animals in EU may have certainly an impact on the transcriptome of animals (Calduch-Giner et al. 2010, Terova et al. 2011, Liu et al. 2014).

Regarding the fact that fish from Gironde clustered with fish experimentally exposed to PCB_170 (cluster 3) suggests that the fin transcriptomic response offers the possibility to predict the presence of a specific toxicant in a field sample. However, it must be noted that whereas fish from Garonne were highly contaminated by PCBs, their transcription profiles did not cluster with fish experimentally exposed to PCBs_50 or Gironde. As evoked earlier, this could be due, at least in part, to the fact that a high variability was observed in the PCBs contamination levels of fish from Garonne. In addition, we must note that fish from Garonne were more closely associated with fish from Certes. This could be explained by their low levels of Cd contamination in comparison to fish from Gironde. Indeed, a lower but significant relationship was observed between fish from Gironde and fish experimentally

exposed to Cd (cluster 3 and 4). This result may suggest a less discriminating power for the detection of Cd contamination by the caudal fin than for PCBs. This is in agreement with the fact that only 40 specific genes were differentially regulated in response to experimental exposure to Cd versus 75 for the PCB_170 condition (Fig. 3). In addition, in order to deepen these results, the genes that were commonly affected in fish from Gironde and in fish experimentally exposed to PCB_170 or Cd_4 were identified. To do this, genes that were differentially transcribed between fish from Gironde (i.e. the most contaminated site) and control animals were identified. A total of 93 genes were found (Table S5). These genes were compared to those that were differentially transcribed between controls and fish exposed to Cd_4 or PCB_170. A total of 37 genes (Table S6) were commonly affected in fish from Gironde and in fish exposed to PCB_170. In comparison, only 19 genes (Table S7) were commonly affected in fish from Gironde and in fish exposed to Cd_4. This result supports the fact that fish exposed to PCB_170 were more closely associated with fish from Gironde than fish exposed to Cd and reinforces the link highlighted by hierarchical clustering analyses. Here, it is noteworthy that the PCBs concentrations used in our experiments were based on the levels found in prey of eels inhabiting the Gironde estuary (Tapie et al. 2011). In contrast, due to technical limitations, the contamination level of Cd used in our experiment appears to be quite high in comparison to the concentration determined in the Gironde estuary (Cd ~ 0.1 $\mu\text{g.L}^{-1}$; Masson et al. 2006). We must note that a previous study showed that Cd contamination by food also plays a non-negligible role in the Cd contamination of wild eels inhabiting the Garonne-Gironde continuum (Pierron et al. 2007). This could partly explain why the responses obtained in fish from Gironde clustered with those obtained in fish experimentally exposed to PCB_170 (i.e. cluster 3) and to a lesser extent with fish exposed to Cd_4 (i.e. cluster 4).

3.3. Liver and caudal fin transcriptomic responses in animals experimentally exposed to Cd

We then investigated if the transcriptomic response of the caudal fin could be as sensitive as that one developed by the liver, i.e. an organ known to be a main site of Cd bioaccumulation and a main target of Cd toxicity in fish (Gul et al. 2004, Van Dyk et al. 2005; Gonzales et al. 2005). We thus compared the transcriptomic profiles of the liver and fin of fish experimentally exposed to Cd. First, statistical analyses were carried out to identify genes that were differentially transcribed in the two organs between the 5 controls and the 5 animals exposed to Cd contamination. Seventy two genes and 77 genes were differentially transcribed

(described in SI in table S3 and S4) in the caudal fin and the liver, respectively. Thus, the number of genes that were differentially transcribed in response to Cd exposure was equivalent in the two tissues, highlighting the detection sensitivity of the caudal fin in detecting exposure to Cd. As in the vast majority of cases when the transcriptomic responses of different tissues are compared, the most of the genes affected by Cd were different between the two tissues and only 16 genes were shared between the two lists of differentially transcribed genes (Table 1). With the hypothesis that common functions affected by Cd across different tissues and notably with liver may play important roles to get more insight into the toxicity mechanisms of Cd in eels, these 16 common genes were further examined.

Foremost, *twf1* and *itgav* genes are involved in cell adhesion and communication; *twf1* (up-regulated in liver and down-regulated in fin) encodes an actin binding protein and promotes epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), whereas *itgav* (down-regulated in liver and up-regulated in fin) is a member of the integrin superfamily adhesion molecules and is involved in cell adhesion, signal transduction and cell to cell interaction (Horton, 1997). Significant changes in the transcription level of these genes could underline a disruption in cell adhesion, a well-known *in vitro* effect of Cd (Prozialeck and Edwards, 2007). Also, three genes encoding for proteins involved in proteolysis, *rnfl23*, *ctse-a* and *man1b1* were differentially transcribed in both tissues. The *ctse-a* gene (down-regulated in both tissues) encodes a protein that is located in the endosome and has an endopeptidase activity. The *rnfl23* gene (down-regulated in liver and up-regulated in fin) is involved in the ubiquitin-proteasome pathway. The gene *Man1b1* (up-regulated in both tissues) is involved in the quality control of glycoproteins in the endoplasmic reticulum (ER) by targeting misfolded proteins to ER-associated protein degradation (Rymen et al. 2013). An induction of the unfolded protein response was already described in the liver of European flounders exposed to Cd at environmental realistic concentrations (Williams et al. 2006). Two genes involved in the regulation of apoptosis were found to be down-regulated in animals exposed to Cd, the *dhodh* and the *shf* gene (Hail et al. 2010). The genes *snapc4* and *U2surp* were found to be modulated by Cd in both organs. These two genes are involved in RNA splicing. Indeed, *U2surp* (up-regulated in liver and down-regulated in fin) is a component of the spliceosome and is involved in pre-mRNA processing (Kuhn et al. 2009). The gene *snapc4* (up-regulated in both tissues) is a transcriptional factor essential for the transcription of the snRNA genes, including U2 spliceosomal snRNA (Schaub et al. 2012). The genes *colla1* and *foxn3* were up-regulated in both organs. These genes are involved in morphogenesis and tissue development and notably in skin and fin development and regeneration for *colla1* (Duran et al. 2011).

The gene *foxl1a* is also involved in tissue development but showed an inverse regulation between fin and liver (table 1). The genes *foxn3* and *foxl1a* encode for two proteins belonging to the forkhead box (FOX) protein family. The FOX proteins are transcription factors that play an important role in the regulation of genes involved in cell growth, proliferation, longevity and differentiation (Lantz et al. 2005). Furthermore, *foxal* was shown to be involved in gene regulation by acting as a pioneer factor binding to nucleosomal DNA (Lupien et al. 2008). FOXA1 recruitment is guided by histone marks. FOXA1 would be then responsible to translate this epigenetic signature into changes in chromatin structure and finally in gene expression (Lupien et al. 2008).

Moreover, two genes that are members of the Polycomb-group (PcG) family, i.e. *eed* and *epc1*, were found to be affected by Cd. This PcG family represents the essential epigenetic system with DNA methylation which is involved in maintaining the transcriptional repressive state of genes (Viré et al. 2006). Furthermore, it was shown that PcG proteins serve as a recruitment platform for DNA methyltransferases, thus indicating a direct connection between the two repression systems. It is noteworthy that a significant increase in the global DNA methylation level was previously described by Pierron et al. (2014) in the liver of eels experimentally exposed to dissolved Cd at 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Also, recent evidences point to a key function of epigenetic marks in alternative splicing regulation. These insights suggest that epigenetic processes and RNA splicing are intimately dependent on each other (Luco et al. 2011). Thus, our results tend to show that the common pattern of gene transcription in fin and liver in response to Cd exposure include mainly genes involved in proteolysis, tissue development and in epigenetic and RNA splicing events.

Table 1: Common differentially transcribed genes in liver and caudal fin of fish experimentally exposed to dissolved Cd at 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Results are presented as fold change as compared to control organisms. Analyses were carried out by means of the class comparison tool available in the BRB array tools software ($P < 0.05$).

Fold change		Symbol	gene name	biological function
Caudal fin	Liver			
1.52	0.68	<i>itgav</i>	Integrin alpha-V	Angiogenesis; cell adhesion; positive regulation of cell proliferation
0.4	1.61	<i>cpn2</i>	Carboxypeptidase N subunit 2	Regulation of the catalytic activity of <i>cpn1</i> ; response to glucocorticoid
0.67	0.61	<i>chst15</i>	Carbohydrate sulfotransferase 15	Chondroitin sulfate biosynthetic process, hexose biosynthetic process
0.69	1.75	<i>tmem106c</i>	Transmembrane protein 106C	/
0.71	1.34	<i>twf1</i>	Twinfilin-1	Negative regulation of actin filament polymerization
0.5	2.01	<i>rnf123</i>	E3 ubiquitin-protein ligase RNF123-like	Ubl conjugation pathway
0.63	0.37	<i>ctse-a</i>	Cathepsin E-A	Proteolysis
1.64	1.43	<i>man1b1</i>	Endoplasmic reticulum mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase	ER-associated protein catabolic process; protein folding; post-translational protein modification
2.96	1.64	<i>col1a1</i>	Collagen alpha-1(I) chain	Morphogenesis; tissue development
0.57	1.39	<i>foxn3</i>	Forkhead box protein N3	Tissue development; negative regulation of transcription, DNA-dependent
1.51	1.55	<i>foxa1-a</i>	Forkhead box protein A1-A	Morphogenesis; development
0.49	0.61	<i>shf</i>	SH2 domain-containing adapter protein F	Apoptotic process
0.51	0.71	<i>dhodh</i>	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone), mitochondrial	Positive regulation of apoptotic process; 'de novo' UMP biosynthetic process
0.44	1.95	<i>u2surp</i>	U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein	RNA processing
1.67	1.62	<i>snpc4</i>	snRNA-activating protein complex subunit 4	Intrahepatic bile duct development; pancreas development; cell proliferation
1.63	1.48	<i>eed</i>	Polycomb protein eed	Negative regulation of transcription, DNA-dependent
0.69	1.73	<i>epc1</i>	Enhancer of polycomb homolog 1	Negative regulation of gene expression, epigenetic

4. Conclusion

Exposure-dependent transcript abundance profiles were detected in the caudal fin of both laboratory and wild contaminated fish, supporting the potential of microarrays and caudal fin clips as a non-lethal method to detect and predict the presence of a specific contaminant. However, while the transcriptomic response of the fin successfully detected the presence of contaminants in wild fish inhabiting the most contaminated site (Gironde), this was less clear for fish inhabiting the intermediate site (Garonne). Finally, genes commonly affected by Cd exposure in caudal fin and liver were found to be involved in tissue development, apoptotic and proteolysis processes, but also in RNA splicing and epigenetic mechanisms.

Acknowledgements

We wish to acknowledge the contributions of our support staff, without whom this study could not have been completed. First, we would like to thank Pr Richard Simon for his help in microarray analyses with BRB array tools. Thanks also to Patrick Girard for its veterinary expertise. This work was supported by the Regional Council of Aquitaine, the Agence Nationale de la Recherche of France (ANR Immortel ANR-10-INTB-1704) and a Strategic Project Grant of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to Patrice Couture and Louis Bernatchez. This work was also supported by the Investments for the future Program, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45).

Lucie Baillon was supported by a collaborative doctoral fellowship between the University of Bordeaux (France) and Université Laval (Québec, Canada).

References

- Baillon, L., Pierron, F., Coudret, R., Normandeau, E., Caron, A., Peluhet, L., Labadie, P., Budzinski, H., Durrieu, G., Sarraco, G., Elie, P., Couture, P., Baudrimont, M., Bernatchez, L. 2015. Transcriptome profile analysis reveals specific signatures of pollutants in Atlantic eels. *Ecotoxicology*. 24(1), 71-84.
- Belpaire, C., Goemans, G., 2007. Eels: contaminant cocktails pinpointing environmental contamination. *ICES J. Mar. Sci.* 64(7), 1423-1436.
- Calduch-Giner, J.A., Davey, G., Saera-Vila, A., Houeix, B., Talbot, A., Prunet, P., Cairns, M.T., Pérez-Sánchez, J., 2010. Microarray technology to assess the time course of liver stress response after confinement exposure in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L). *BMC Genomics*. 11-193.
- de Lafontaine, Y., Gagnon, P., Côté, B., 2010. Abundance and individual size of American eel (*Anguilla rostrata*) in the St. Lawrence River over the past four decades. *Hydrobiologia*. 647: 185-198.
- Denslow, N., Garcia-Reyero, N.A., Barber, D.S., 2007. Fish ‘n’ chips: the use of microarrays for aquatic toxicology. *Mol. Biosyst.* 3, 172-177.
- Devin, S., Giamberini, L., Pain-Devin, S., 2014. Variation in variance means more than mean variations: What does variability tell us about population health status? *Environ. Int.* 73, 282-287.
- Durán, I., Marí-Beffa, M., Santamaría, J.A., Becerra, J., Santos-Ruiz, L., 2011. Actinotrichia collagens and their role in fin formation. *Dev. Biol.* 354, 160-172.
- Durrieu, G., Maury-Brachet, R., Girardin, M., 2005. Contamination by heavy metals (Cd, Zn, Cu, and Hg) of eight fish species in the Gironde estuary (France). *Estuaries*. 28(4), 581–591.
- Feng, S., Tillier, E.R.M., 2007. A fast and flexible approach to oligonucleotide probe design for genomes and gene families. *Bioinformatics*. 23(10), 1195-1202.
- Friguet, C., Kloareg, M., Causeur, D., 2009. A factor model approach to multiple testing under dependence. *J. Am. Stat. Assoc.* 104(488), 1406–1415.
- Geeraerts, C., Belpaire, C., 2010. The effects of contaminants in European eel: a review. *Ecotoxicology*. 19, 239-266.
- Gonzalez, P., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.P., 2006. Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *BioMetals*. 19, 225-235.
- Gül, S., Belge-Kurutas, E., Yıldız, E., Sahan, A., Doran, F., 2004. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. *Environ. Int.* 30, 605-609.

- Hail, N.Jr., Chen, P., Kepa, J.J., Bushman, L.R., Shearn, C., 2010. Dihydroorotate dehydrogenase is required for N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced reactive oxygen species production and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 109-116.
- Haro, A., Richkus, W., Whalen, K., Hoar, A., Busch, W.D., Lary, S., Brush, T., Dixon, D. 2000. Population decline of the American eel: Implications for research and management. *Fisheries*. 25(9), 7-16.
- Horton, M.A., 1997. The $\alpha\beta 3$ Integrin "Vitronectin Receptor". *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29 (5), 721-125.
- Kuhn, A.N., Van Santen, M.A., Schwienhorst, A., Urlaub, H., Lürmann, R., 2009. Stalling of spliceosome assembly at distinct stages by small-molecule inhibitors of protein acetylation and deacetylation. *RNA*. 15, 153-175.
- Lantz, K.A., Kaestner, K.H., 2005. Winged-helix transcription factors and pancreatic development. *Clin. Sci.* 108, 195-204.
- Liu, S., Gao, G., Palti, Y., Cleveland, B.M., Weber, G.M., Rexroad, C.E., 2014. RNA-seq analysis of early hepatic response to handling and confinement stress in rainbow trout. *Plos one*. 9(2), e88492.
- Loizeau, V., Menesguen, A., 1993. A steady-state model of PCB accumulation in dab food web. *Oceanol. Acta*. 16 (5-6), 633-640.
- Lupien, M., Eeckhoute, J., Meyer, C.A., Wang, Q., Zhang, Y., Li, W., Carroll, J.S., Liu, X.S., Brown, M., 2008. FoxA1 translates epigenetic signatures into enhancer driven lineage-specific transcription. *Cell*. 132(6), 958-970.
- Luco, R.F., Allo, M., Schor, I.E., Kornblihtt, A.R., Misteli, T., 2011. Epigenetics in Alternative Pre-mRNA Splicing. *Cell*. 144, 16-26.
- Masson, M., Blanc, G., Schäfer, J., 2006. Geochemical signals and source contributions to heavy metal (Cd, Zn, Pb, Cu) fluxes into the Gironde Estuary via its major tributaries. *Sci. Tot. Environ.* 370, 133-146.
- Mcshane, L.M., Radmacher, M.D., Freidlin, B., Yu, R., Li, M.C., Simon, R., 2002. Methods for assessing reproducibility patterns observed in analyses of microarray data. *Bioinformatics*. 18, 1462-1469.
- Pierron, F., Baudrimont, M., Bossy, A., Bourdineaud, J.P., Brèthes, D., Elie, P., Massabuau J.C., 2007. Impairment of lipid storage by cadmium in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquat. Toxicol.* 88, 304-311.
- Pierron, F., Baillon, L., Sow, M., Gotreau, S., Gonzalez, P., 2014. Effect of Low-Dose Cadmium Exposure on DNA Methylation in the Endangered European Eel. *Environ. Sci. Technol.* 48, 797-803.

- Poss, K.D., Keating, M.T., Nechiporuk, A., 2003. Tales of Regeneration in Zebrafish. *Dev. Dynam.* 226, 202-210.
- Poynton, H.C., Loguinov, A.V., Varshavsky, J.R., Chan, S., Perkins, E.J., Vulpe, C.D., 2008a. Gene Expression Profiling in *Daphnia magna* Part I: Concentration-Dependent Profiles Provide Support for the No Observed Transcriptional Effect Level. *Environ. Sci. Technol.* 42, 6250-6256.
- Poynton, H.C., Zuzow, R., Loguinov, A.V., Perkins, E.J., Vulpe, C.D., 2008b. Gene Expression Profiling in *Daphnia magna*, Part II: Validation of a Copper Specific Gene Expression Signature with Effluent from Two Copper Mines in California *Environ. Sci. Technol.* 42, 6257-6263.
- Prozialeck, W.C., Edwards, J.R., 2007. Cell Adhesion Molecules in Chemically-Induced Renal Injury. *Pharmacol. Ther.* 114(1), 74-93.
- Pujolar, J.M., Jacobsen, M.W., Als, T.D., Frydenberg, J., Munch, K., Jónsson, B., Jian, J.B., Cheng, L., Maes, G.E., Bernatchez, L., Hansen, M.M., 2014. Genome-wide single-generation signatures of local selection in the panmictic European eel. *Mol. Ecol.* 23(10), 2514-28.
- Rymen, D., Peanne, R., Millón, M.B., Race, V., Sturiale, L., Garozzo, D., Mills, P., Clayton, P., Asteggiano, C.G., Quelhas, D., Cansu, A., Martins, E., Nassogne, M.C., Gonçalves-Rocha, M., Topaloglu, H., Jaeken, J., Foulquier, F., Matthijs, G., 2013. MAN1B1 Deficiency: An Unexpected CDG-II. *PLoS Genet.* 9(12), e1003989.
- Schaub, M., Justin Nussbaum, J., Verkade, H., Elke, A., Ober, E.A., Didier, Y.R., Stainier, D.Y.R., Takuya, F., Sakaguchi, T.F., 2012. Mutation of zebrafish *Snapc4* is associated with loss of the intrahepatic biliary network. *Dev. Biol.* 363(1), 128-137.
- Schebesta, M., Lien, C.L., Engel, F.B., Keating, M.T., 2006. Transcriptional Profiling of Caudal Fin Regeneration in Zebrafish. *ScientificWorldJournal.* 6(S1), 38-54.
- Tapie, N., 2006. Contamination des écosystèmes aquatiques par les PCB et PBDE : application à l'estuaire de la Gironde. Doctoral dissertation, Université de Bordeaux, Bordeaux, France.
- Tapie, N., Budzinski, H., Le Ménach, K., 2008. Fast and efficient extraction methods for the analysis of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in biological matrices. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 2169-2177.
- Tapie, N., Le Menach, K., Pasquaud, S., Elie, P., Devier, M.H., Budzinski, H., 2011. PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary: From glass eels to silver eels. *Chemosphere.* 83, 175-85.
- Terova, G., Cattaneo, A.G., Preziosa, E., Bernardini, G., Saroglia, M., 2011. Impact of acute stress on antimicrobial polypeptides mRNA copy number in several tissues of marine sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *BMC Immunol.* 12(1), 69.

- Thrush, S.F., Hewitt, J.E., Dayton, P.K., Coco, G., Lohrer, A.M., Norkko, A., 2009. Forecasting the limits of resilience: integrating empirical research with theory. *P. Roy. Soc. Lond. B. Bio.* 276(1671), 3209-17.
- van Dyk, J.C., Pieterse, G.M., van Vuren, J.H.J., 2007. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66, 432-440.
- Veldhoen, N., Stevenson, M.R., Skirrow, R.C., Rieberger, K.J., van Aggelen, G., Meays, C.L., Helbing, C.C., 2013. Minimally invasive transcriptome profiling in salmon: Detection of biological response in rainbow trout caudal fin following exposure to environmental chemical contaminants. *Aquat. Toxicol.* 142 (143), 239-247.
- Viré, E., Brenner C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C., Morey L., Van Eynde A., Vanderwinden J.M., Bollen M., Esteller M., Di Corce L., de Launoit Y., Fuks F., 2006. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature.* 439, 871-874.
- Williams, T.D., Diab, A.M., George, S.G., Godfrey, R.E., Sabine, V., Conesa, A., Minchin, S.D., Watts, P.C., Chipman, J.K., 2006. Development of the GENIPOL European Flounder (*Platichthys flesus*) Microarray and Determination of Temporal Transcriptional Responses to Cadmium at Low Dose. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6479-6488.
- Wirth, T., Bernatchez, L., 2003. Decline of North Atlantic eels: a fatal synergy? *Proc. R. Soc. B. Biol. Sci.* 270(1516), 681-688.

3. Conclusion

Le déclin de l'espèce *Anguilla anguilla* a mené naturellement à développer une méthode non-invasive pour détecter les effets des contaminants en milieu naturel. De par sa faculté de régénération après amputation, nous avons prélevé une partie de la nageoire caudale de l'anguille pour tester sa capacité à répondre à des contaminations séparées d'une part puis dans des conditions de multi-contamination (terrain) d'autre part au moyen de la puce ADN. Les résultats ont montré la sensibilité de la nageoire vis-à-vis de la contamination au niveau transcriptomique, marquée par un grand nombre de gènes différentiellement exprimés entre les témoins et les anguilles contaminés au Cd ou aux PCBs. Cette sensibilité notable a mené ensuite à comparer les profils transcriptomiques obtenus à partir d'anguilles prélevées sur les différents sites français et des anguilles exposées en laboratoire. La hiérarchisation des profils réalisée à l'aide d'une analyse en regroupement hiérarchique a montré une bonne discrimination des individus selon leur site de prélèvement ou leur exposition en laboratoire à un contaminant. La distribution plus hétérogène des témoins expérimentaux pourrait souligner une plus forte variabilité interindividuelle chez les poissons non soumis à des pressions de contamination. Un résultat intéressant était le rapprochement des profils des individus de la Gironde et ceux exposés aux PCBs en laboratoire et à une moindre mesure avec les individus expérimentalement exposés au Cd. L'exposition aux PCBs réalisée par voie trophique a été élaborée en contaminant la nourriture à des concentrations retrouvées dans les proies des anguilles vivant dans l'estuaire de la Gironde. L'exposition au Cd par la voie directe, correspondait quant à elle, à 4 fois celle retrouvée en Gironde, du fait de difficultés techniques à maintenir des concentrations très faibles. Ainsi, la réponse transcriptomique de la nageoire à l'exposition aux PCBs semble offrir la possibilité de prédire une contamination à ces composés chez des animaux prélevés sur le terrain et dans une moindre mesure à l'exposition au Cd par l'eau ou en milieu naturel. Enfin la comparaison des réponses du foie et de la nageoire pour la contamination au Cd a révélé des réponses très différentes en termes de processus biologiques affectés par le métal, soulignant l'influence notable de la nature de l'organe étudié. Cependant, 16 gènes ont été retrouvés communs entre les deux tissus. Outre des gènes impliqués dans la communication cellulaire ou le métabolisme des protéines, des gènes impliqués dans des mécanismes épigénétiques ont également été décrits.

Cette étude a ainsi montré la sensibilité de la nageoire à détecter et discriminer différentes contaminations expérimentales et *in situ*. La nageoire semblerait être un organe de choix pour démêler et hiérarchiser les effets de chaque contaminant en milieu naturel.

Nous avons cherché au cours des précédents chapitres à mieux comprendre et démêler les effets isolés des contaminants au moyen du séquençage haut débit et de la puce à ADN dans les milieux naturels où contaminants et facteurs naturels sont en mélange. L'anguille Européenne, l'un de nos modèles d'étude, est une espèce dont les populations sont en danger critique d'extinction et la pollution est l'une des hypothèses avancée pour en expliquer ce déclin. Dans le prochain chapitre de cette thèse, nous allons tenter d'évaluer le possible impact de la pollution sur les capacités de reproduction de l'anguille Européenne.

Chapitre 6

*Impact de la pollution sur la maturation des gonades
d'anguilles européennes argentées femelles*

1. Introduction

Au cours des précédents chapitres, le séquençage haut débit et la puce ADN ont été utilisés dans le but de détecter et démêler les effets des contaminants sur des anguilles au stade jaune vivant dans des systèmes aquatiques complexes, les estuaires du Saint-Laurent et de la Gironde et leurs affluents. Le stade immature des anguilles est caractérisé par une accumulation de graisses, i.e. de réserves d'énergie, qui servira une fois les anguilles arrivées au stade argenté à assurer la maturation de leurs organes sexuels et leur migration transatlantique. Cependant l'accumulation des graisses s'accompagne également d'une accumulation de contaminants dans ces dernières.

Des travaux ont mis en évidence d'une part la complexité des facteurs induisant la maturation des organes sexuels de l'anguille européenne (Dufour et al., 1983, 1989, Dufour, 1994 ; Pedersen et al. 2003 ; Vidal et al., 2004) et d'autre part que les contaminants présents dans les organismes pouvaient compromettre le processus de reproduction. Une étude avait en effet montré que les contaminants présents dans le muscle des anguilles pouvaient se transférer de la mère vers l'embryon et induire des malformations au cours de son développement (Palstra et al. 2006). Le Cd également entraînerait une consommation accrue des réserves lipidiques conduisant les individus à un épuisement prématuré et un important phénomène d'atrésie ovocytaire (Pierron et al. 2008). Ce dernier chapitre avait ainsi pour objectif de répondre à une question, à portée plus écologique, « *la pollution anthropique peut-elle compromettre la capacité de reproduction des anguilles et contribuer ainsi au déclin de l'espèce ?* ». Pour répondre au mieux à cette question, nous avons utilisé la puce à ADN sur des échantillons de gonades d'anguilles argentées femelles maturées artificiellement en laboratoire et issues de deux sites en France marqués pour l'un par une faible présence de contaminants, le domaine de Certes et l'autre au contraire par une forte présence de polluants tant métalliques qu'organiques, la Gironde. L'utilisation de la puce ADN sur le stade argenté de l'anguille avait ainsi pour objectif d'évaluer les effets potentiels des contaminants sur la capacité des anguilles à se développer sexuellement et donc à se reproduire.

2. Article

Title: Gonadal transcriptome analysis of wild contaminated female European eels during artificial gonad maturation

Authors : Lucie Baillon^{1,2}, Jennifer Oses^{1,2}, Fabien Pierron^{1,2*}, Sarah Bureau du Colombier³, Antoine Caron⁴, Eric Normandeau⁵, Patrick Lambert³, Patrice Couture⁴, Pierre Labadie^{1,2}, Hélène Budzinski^{1,2}, Sylvie Dufour⁵, Louis Bernatchez⁶, Magalie Baudrimont^{1,2}

¹Univ. Bordeaux, UMR EPOC CNRS 5805, F-33400 Talence, France

²CNRS, EPOC, UMR 5805, F-33400 Talence, France

³Irtsea, UR EABX, 50 avenue de Verdun-Gazinet, 33612 Cestas, France

⁴Institut National de la Recherche Scientifique, Centre Eau Terre Environnement, 490 de la Couronne, Québec (Québec) G1K 9A9 Canada

⁵Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR BOREA UPMC, CNRS 7208, IRD 207, UCBN, 7 rue Cuvier CP 32, F-75231 Paris, France

⁶Département de biologie, Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS), Université Laval, Québec (Québec) G1V 0A6 Canada

*Corresponding author: Fabien Pierron

f.pierron@epoc.u-bordeaux1.fr Tel: +33 556 223 927 FAX: +33 540 708 504

Abstract

Since the early 1980s, the population of European eels (*Anguilla anguilla*) has dramatically declined. Nowadays, the European eel is listed on the red list of threatened species (IUCN Red List) and is considered as critically endangered of extinction. Pollution is one of the putative causes for the collapse of this species. Among their possible effects, contaminants gradually accumulated in eels during their somatic growth phase (yellow eel stage) would be remobilized during their reproductive migration leading to potential toxic events in gonads. The aim of this study was to investigate the effects of organic and inorganic contaminants on the gonad development of wild female silver eels. Female silver eels from two sites with differing contamination levels were artificially matured. Transcriptomic analyses by means of a 1000 candidate gene cDNA microarray were performed on gonads after 11 weeks of maturation. The transcription levels of several genes, that were associated to the gonadosomatic index (GSI), were involved in mitotic cell division but also in gametogenesis. Genes associated to contaminants were mainly involved in the mechanisms of protection against oxidative stress, in DNA repair, in the purinergic signaling pathway and in steroidogenesis, suggesting an impairment of gonad development in eels from the polluted site. This was in agreement with the fact that eels from the reference site showed a higher gonad growth in comparison to contaminated fish.

Key words: *Anguilla anguilla*, silver stage, contamination, gonad development, transcriptomic.

Introduction

Historically abundant and widespread in Europe, European eels (*Anguilla anguilla*) have suffered a sharp decline and the species' recruitment now represents only one tenth of what it was in the early 1980s (Stone 2003; ICES report 2013). It is currently considered as critically endangered of extinction by the International Union for Conservation of Nature (IUCN). European eel is a catadromous fish species with a complex life cycle including marine (larval phase, sexual maturation and spawning) and continental (feeding and somatic growth) environments. The unusual life cycle of European eels makes them particularly vulnerable to pollution. Reproduction of the species takes place in the Sargasso Sea. Eel larvae drift back to the European coasts following oceanic currents. After metamorphosis of the larvae into glass eels, the organisms reach the juvenile growth phase stage (yellow eel) in continental habitats. During this stage, for up to 20 years, eels feed in order to grow and accumulate fat reserves. Then, yellow eels undergo a second metamorphosis called silvering which prepares the future genitors (silver eels) for their transoceanic reproductive migration (Tesch et al., 2003; Van Ginneken and Maes, 2005). However, when silver eels leave the European coasts, their gonads are still immature and maturation is blocked at a prepubertal stage (Vidal et al., 2004). This implies that gonad development must occur during the 5500 km transoceanic migration. During the migration, silver eels no longer feed and use their lipid reserves accumulated during the growth phase (yellow eel stage) for swimming and gonad maturation. Finally, this life cycle ends with the death of genitors after reproduction. During the growth phase, yellow eels will accumulate lipids but also metal and organic contaminants present in continental environments (Durrieu et al., 2005; Tapie et al., 2011). The lipid reserves will be remobilized but contaminants could be also remobilized toward gonads during their reproductive migration (Robinet and Feunteun, 2002; Palstra et al., 2006; Pierron et al., 2008). Consequently, a particular emphasis was placed in recent years on the hypothesis that spawner quality might play an essential role in the decline of the European eel. However, despite the increasing awareness that pollution might impair the reproductive success of silver eels, the potential effects of pollution on the eels' gonad development remain poorly known. Investigating the effects of contaminants on developing gonads in future spawners is highly relevant since effects observed at the individual level have implications at the population level.

The aim of this study was to investigate the possible impacts of contaminants on gonads during artificial maturation of European female silver eels by means of a

transcriptomic approach using a DNA microarray comprising 1000 candidate gene targets (Baillon et al., 2015).

2. Materials and methods

2.1 Experimental design

All procedures used in this experiment were approved by the Aquitaine fish-birds ethics committee. Migrating female silver eels (*Anguilla anguilla*) were captured during their continental downstream migration in winter 2012-2013, in the Arcachon Bay in the Domaine de Certes salt marshes (southwest of France, 44°41'18"N 1°1'39"W) a site considered as “clean”, and in the Gironde estuary (45°12'06.62"N 0°43'34.72"O), considered as highly contaminated (Baillon et al., 2014). The animals were transferred to the laboratory (Irstea experimental station), individually marked with pit-tags and randomly mixed in two separate swim tanks (salinity 30 ‰, natural seawater) thermostated at 15°C. After at least one month of acclimation period, 5 eels from Gironde and 8 from Certes were removed and dissected.

Remaining eels were then submitted to water current to force them to swim at a speed around 16 cm.s⁻¹ (Davidsen et al., 2011). To induce gonad maturation, eels received one perivisceral injection per week of CPE without anesthesia at a dose equivalent to 20 mg of pituitary powder/kg body weight, according to a method previously described (Durif et al., 2006). Sixteen animals, 8 fish per sampling site, were removed for analysis after 11 CPE injections.

At each sampling time, the total length and weight were recorded for each fish in order to estimate the Fulton condition factor (K): $(\text{weight (g)} \times 10^5) / (\text{length (mm)}^3)$. Fish ovaries were weighed to calculate the gonadosomatic index (GSI expressed as a percentage: $(\text{gonad weight} / \text{total body weight}) \times 100$). Samples for genetic analyses were stored in RNA later at -20°C until needed. For both organic and metal analyses, samples were stored at -80°C.

During the two steps (i.e. acclimation and hormonal treatment), fish were not fed as eels undergo a natural period of fasting at the silver stage.

2.2 Metal analyses

Gonad samples were freeze-dried in PFA vials (Savillex) and kept in these vials during the whole digestion process. Sub-samples of 50 mg were processed in a mercury analyser (Milestone DMA-80) and MESS-3 certified reference material (National Research Council

Canada) was used, with a recovery rate of $98.8 \pm 2.5\%$. The rest of the samples were digested overnight at room temperature in pure trace metal grade nitric acid (HNO_3). Sample digestion was completed by autoclave (All American 25X-1) for 2 hours at 15 PSI. Samples were then diluted in Milli-Q water to obtain a final concentration of 10% HNO_3 . Metal concentrations for Ag, As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn were measured by inductively coupled plasma - mass spectrometry (ICP-MS; Thermo Scientific XSeries 2), inductively coupled plasma - atomic emission spectrometry (ICP-AES; Varian Vista AX) or both methods. Blanks and standards (TORT-2 and DOLT-4, National Research Council Canada) were submitted to the same digestion protocol as gonad samples to monitor the efficiency of the procedure. Recovery rates were: Ag = $93.4 \pm 10.3\%$; As = $99.8 \pm 6.1\%$; Cd = $105.1 \pm 5.8\%$; Cr = $76.6 \pm 16.9\%$; Cu = $98.7 \pm 2.6\%$; Ni = $97.6 \pm 3.8\%$; Pb = $92.1 \pm 13.1\%$; Se = 98.9 ± 6.2 ; Zn = $105.0 \pm 2.2\%$ (mean \pm SD, n = 10).

2.3 Organic contaminant analyses

Analysis of the seven indicator PCBs (CB50+28, CB52, CB101, CB118, CB138, CB153, and CB180), 14 OCPs (hexachlorobenzene or HCB, lindane or γ -HCH, dieldrin, heptachlor, heptachlorepoxyde, *cis*-chlordane, *trans*-nonachlor, mirex, and DDTs), and 4 PBDEs (BDE47, BDE99, BDE119, and BDE153) were performed on gonad samples following the procedures described by Tapie et al., (2008). Lipids were determined by gravimetry after filtration and evaporation of an aliquot of the DCM extract. Persistent organic pollutants (POPs) were extracted using microwave assisted extraction and analyses were carried out on an HP 5890 series II gas chromatograph coupled to a ^{63}Ni electron capture detector. For all the analyses, POPs were quantified relative to internal standards. Quality control consisted of the analysis of solvent procedural blanks, reproducibility and repeatability tests, injection of standard solutions as unknowns and analysis of certified reference material (SRM) 2974a (National Institute of Standards and Technology, USA) for PCBs, OCPs and PBDEs. The recoveries for five replicates on this SRM were between 70% and 110% with reproducibility ranging from 10% to 20% depending on the compounds. As described in Labadie et al., (2010), POP levels were blank corrected and the method detection limit (LoD) was derived from the blank value variability. For PCBs, LoQs were comprised between 0.2 ng/g dw and 2 ng/g dw; for OCPs they were comprised between 0.1 ng/g dw and 0.4 ng/g dw; for PBDEs they were comprised between 0.1 ng/g dw and 0.2 ng/g dw.

2.4 RNA extraction, labeling, and cDNA hybridization

Total RNA was extracted from the gonads of 8 individuals per condition. RNA was extracted from 20-25 mg of tissue using the SV total RNA isolation system (Promega) with minor modifications. Briefly, for the first step of reverse-transcription (RT), 15µg of total RNA were used. After RT reaction, cDNA purification was made with Qiagen PCR purification kit following the manufacturer's protocol. Purified cDNA were then labeled with CyDye™ Post-Labelling Reactive Dye Pack (Cyanine 3 for sample and Cyanine 5 for reference). In order to normalize microarray data, we used a common reference design. The reference was composed by pooling total RNA from liver of 30 wild eels from the clean site; i.e. Certes (15 fish collected in year 2011 and 15 in year 2012). This reference was combined in equal amounts with each sample before to be hybridized on the microarray slide (15 hours at 55°C). A total of 16 microarrays were used, 8 microarrays were performed for each sampling site (i.e. Certes and Gironde). Each sample has been hybridized once on DNA microarray. Data acquisition was carried out by means of the Innoscan 710 microarray scanner (Innopsys) using Mapix software. More details on sample preparation and microarray processing are available in NCBI/ Gene Expression Omnibus (GEO) under the accession number GPL19017.

2.5 Statistical analysis

For the contaminant analyses, comparisons among fish groups were performed by analysis of variance (ANOVA), after checking assumptions of normality and homoscedasticity of the error terms. When the assumptions were not met as deduced graphically and from ad-hoc tests, we used box-cox data transformations or the non-parametric Kruskal-Wallis test. If significant effects were detected, the Least Square Deviation (LSD) or U-Mann Whitney tests were used to determine whether means between pairs of samples were significantly different from one another. Computations were performed using STATISTICA version 6.1 software (StatSoft, USA). A probability of $P < 0.05$ was considered significant for all analyses. Numerical results are given as means \pm SE.

Concerning microarrays, the filtering of raw data was done for both green and red channels. The median foreground (F635median and F532median) and median background (B635median and B532median) were used. If the ratio Fmedian/Bmedian was lower than 1.5, data were removed from the analysis. In addition, data from bad replicates spots (three spots for each probe) were excluded from the data set. For each spot, the background was removed

of the foreground and the mean of triplicates was then calculated. Finally, both green and red channels were used for data normalization. Normalization and statistical analysis were done by using the BRB-arrayTools version 4.4.0 software package (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>). Each array was median-normalized over entire arrays and genes were excluded if 50% of values were missing in the complete set of arrays. Microarray data have been deposited on the NCBI/Gene Expression Omnibus (GEO) platform under accession number GSE64278. In order to detect differences in transcription profiles among the conditions, data were analyzed by means of the class comparison test available in the BRB software which is similar to the Statistical Analysis of Microarrays (SAM).

Principal Component Analysis (PCA) and Spearman's Rank Correlation Analysis (SRCA) were used to help identifying a set of contaminants or morphometric traits that best described the transcription pattern of the genes that were differentially transcribed between fish from Certes and Gironde. PCA was used here to identify contaminants and morphometric traits from the initial list that were highly correlated with the first two components. Variables that were not strongly correlated with the first few components were excluded from further analysis. Analyses were carried by using XLSTAT Version 2012.6.08 (Addinsoft).

3. Results and discussion

3.1 GSI and pollutant bioaccumulation

Despite no significant difference was observed at T11 between the GSI of fish from Certes and Gironde, the GSI of eels from Certes increased 3.5-fold, compared to 2.4-fold for eels from Gironde between the beginning of the experiment (T0) and after 11 weeks (T11) of artificial maturation. This increase was statistically significant for Certes but not for Gironde (Fig. 1). This suggests that pollution could have a negative impact on gonad development in female eels, i.e. pollution could impair or delay gonad maturation. However, since Certes and Gironde are two distinct aquatic ecosystems, we cannot rule out an effect of other abiotic or biotic factors. Yet, it is noteworthy that fish from Certes and Gironde did not differ significantly at T0 in term of length, weight or condition index (Table 1), i.e. factors that are known to influence the maturation response of female silver eels (Durif et al., 2006). After 11 weeks of hormonal treatment, only the gonad weight of eels from Certes significantly increased. However, the total weight of eels from the two sites significantly differed at T11. Furthermore, a high variability in GSI for eels from Gironde was observed after 11 weeks of

CPE treatment, suggesting a high variability of the response to hormonal treatment in this group. This high variation among individuals from Gironde reflects that some fish had well-developed gonads while others showed no development at all.

Concerning the bioaccumulation levels of contaminants at T11 in ovaries, results are given in term of contaminant content (ng/whole tissue) in order to avoid a weight dilution phenomenon and to compare fish between the two sampling sites (Table 2). For metals, except for chrome (Cr), nickel (Ni) and arsenic (As), bioaccumulation levels measured in gonads showed significant differences between animals from Certes and Gironde. Non-essential metals such as silver (Ag), cadmium (Cd) and mercury (Hg) showed significantly higher levels in gonads of eels from Gironde compared to fish from Certes. This is in agreement with the fact that the Gironde Estuary is a historically Cd-contaminated ecosystem (Durrieu et al., 2005). Moreover, recent studies have reported high levels of Ag in surface water and suspended particulate matter along the Gironde Estuary (Lanceleur et al., 2013). In contrast to non-essential metals, essential metals such as copper (Cu), selenium (Se) and zinc (Zn) showed significant lower levels in gonads from Gironde compared to Certes. Regarding Cu and Zn, these two metals are known to accumulate in gonads of fish during oocyte growth and maturation (Riggio et al., 2003). Thus, the lower Zn and Cu bioaccumulation levels in eel gonads for Gironde could be a consequence of the lower growth of their gonads in response to CPE treatment in comparison to fish from Certes. The content of organic contaminants in gonads was significantly higher in animals from Gironde than in Certes, except for lindane and 2,4'DDT, an organochlorinated pesticide and a metabolite of DDT. Nevertheless, total organo-chlorine pesticides (OCPs) and PCBs contents in the ovaries were significantly 6.9- and 7.5-times higher in fish from Gironde in comparison to fish from Certes, respectively (Table 2). Moreover, whereas polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) were not detectable in gonads of fish from Certes, PBDEs content reached a mean of 209.69 ± 21.61 ng (dw) in fish from Gironde. Thus, contaminant levels in fish from Certes were much lower than in eels from Gironde, supporting the use of Certes as a relatively pristine site suitable as a reference for this study.

3.2. Gonads microarray analysis

Seventeen genes were found to be differentially transcribed between fish from Certes and Gironde ($P < 0.01$) (Table 3). The first two components (shown on fig. 2A) represented 72.95% of total variability (52.41% and 20.54% for each it). PCA showed a clear division

between genes correlated with GSI or contaminants. Genes associated with GSI were under-expressed in most of the animals from Gironde. These included *polyadenylate-binding protein* (*pabpc1*), *protein furry homolog* (*fry*), *prefoldin subunit 6* (*pfdn6*), *Golgi resident protein GCP60* (*acbd3*), *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase CYLD* (*cyld*), *Zinc finger CCCH domain-containing protein 13* (*zc3h13*), *kinectin* (*ktn1*) and *nardilysin* (*ndr1*). In contrast, genes associated to contaminants (i.e. modulated by pollution) were over-expressed in animals from Gironde and were particularly associated to OCPs, PCBs, Hg, Cd, Ag and Se. These included *forkhead box protein O1* (*foxo1*), *ethanolamine-phosphate cytidyltransferase* (*pcyt2*), *GTP-binding protein 1* (*gtpbp1*), *phosphoserine aminotransferase* (*psat1*), *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like* (*hnrp1l*), *ephrin-A4* (*efNA4*), *ferredoxin mitochondrial* (*fdx1*) and *COP9 signalosome complex subunit 3* (*cops3*). Eels' distribution on these two axes showed two distinct groups including animals from Certes on one side (left side) and animals from Gironde on other side (right side) (Fig. 2B). By projection on the correlation circle (fig.2A), the Certes group seemed to be more associated to GSI, i.e. associated to gonad growth and the Gironde group seemed more associated to contaminants. However, two Gironde individuals, Gironde 715 and 713, were placed on the left side of the axis 2. Individual contamination (data not shown) indicated that the Gironde 713 animal contained low tissue concentrations of inorganic contaminants but similar concentrations of POPs in comparison to the other fish from the Gironde estuary. Concerning Gironde 715, this animal presented a high GSI (9.17%) in comparison to the other fish from the Gironde. These findings show that while pollution may be an explanation for some of the results obtained in the present study, it cannot be fully responsible for all of the observed variability and other factors are involved in the response of animals to hormonal treatment.

Concerning genes that were positively correlated with GSI, previous studies carried out in male and female mice showed that the *pabpc1* gene is involved in gametogenesis (Ozturk et al., 2012 and 2014). Stable mRNA during the multi-step differentiation from germ cells to gametes is particularly important, and *pabpc1* plays a role in both mRNA stability and longevity (Féral et al., 2001). The *fry* gene plays a role in cell division. The mechanism is not well understood, yet in mammals *fry* seems to regulate the activity of another gene that was down-regulated in eels from Gironde, *ndr1*, which is involved in cellular polarity. More precisely, *ndr1* encodes for a protein which primary role is the alignment of chromosomes on the mitotic spindle during cell division in mammalian cells (Chiba et al., 2009). The *pfdn6*

gene is also involved in cell division and in some parts of gametogenesis, notably chromosomal migration to the most distal ends of the cell during gonad development (Lundin et al., 2008). The *abcd3* gene is known to be involved in steroidogenesis. Cholesterol, a building block for the synthesis of steroid hormones, must enter the mitochondria before a series of reactions which transform it into progesterone. The transfer of cholesterol into the mitochondrion is regulated by the protein encoded by the *abcd3* gene (Fan et al., 2010). This step allows the synthesis of a complex macromolecular signal which drives cholesterol metabolism. Translation of the *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (cylt)* mRNA produces a protein known to regulate spermatogenesis and fertility in male mice (Wright et al., 2007). This gene was also found to be expressed in the ovaries of *Drosophila melanogaster* (Tsichritzis et al., 2007). The *kinectin* gene (*ktn1*) is involved in the transport of various cellular organelles and vesicles along the microtubules in the cytoplasm. This protein also binds the translation elongation factor-delta and may be involved in the assembly of the elongation factor-1 complex (Bai et al., 2006). Despite the paucity of research on the *zc3h13* gene, one article by Vizeacoumar (2013) shows that it plays a key role in chromosome segregation during the cell cycle. Overall, the genes that appeared associated to GSI in this study are generally involved in mitotic cell division. This could be linked to a proliferation of follicle cells but also to a resumption of meiosis since some of the genes that were identified are involved in chromosome segregation, i.e. a mechanism that occurs during both mitosis and meiosis. The higher GSI of animals from Certes compared to Gironde corroborates this possibility.

Regarding genes which transcription levels were correlated to the contaminants, many studies have shown that these genes encode for proteins involved in cell membrane repair, oxidative stress response, cell division and apoptosis (Essers et al., 2004). The *pcyt2* gene for example plays a role in membrane fusion and assembly of contractile rings which allow separation into two daughter cells via the biosynthesis of phosphatidyl ethanolamine (Pavlovic and Bakovic, 2013). The *hnnp1l* gene encodes for a protein known for its role in RNA splicing and telomere biogenesis, but more so for its role in DNA repair (Han et al., 2013). The expression of *psat1* activates biosynthesis of serine, an amino acid. A recent study showed that overexpression of this gene is a marker of ovarian cancer in humans (Toyama et al., 2012). Interestingly, strong and significant correlations (Spearman coefficient > 0.8; $P < 0.05$) were observed among the transcription levels of *entpd8*, *efna4* and *gtpbp1*. This indicates that they might be co-regulated and implicated in a common biological process. The purinergic signaling pathway could be one of these processes (Fig. 3). ATP and ADP

(adenosine tri- and diphosphate) are intermediates secreted into the extracellular space by a cell exposed to stimuli (pH, UV, reactive oxygen species; Burnstock, 2014), to communicate with adjacent cells. Here, these messages could be taken up by the enzyme ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (ENTPDase) and bound to purine receptors in the membrane of a neighboring cell. Among ENTPDase, the gene *entpd8* was up-regulated in eels from Gironde. The *entpd8* gene encodes for a transmembrane protein that hydrolyzes ATP into ADP (Kojima et al., 2011). Both ATP and ADP could activate purinergic membrane receptors coupled to G proteins. The latter are implicated in numerous signaling processes, including the activation of the PI3K/Akt signal. Among the genes encoding for G proteins, the gene *gtpb1* was overexpressed in contaminated eels. G protein activation initiates an activation cascade of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K), phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP3) and ultimately phosphorylation of a protein kinase, Akt (Roy et al., 2010). In its phosphorylated form, Akt protein adds a phosphate group to the transcription factor FOXO1 which is present in the nucleus. FOXO1 is then inactivated and a protein binds to it allowing its passage from the nucleus to the cytoplasm where it is degraded by the proteasome. In animal gonads, the primary functions of FOXO1 are to stop the cell cycle, initiate apoptosis, regulate glucose homeostasis and activate the production of manganese superoxide dismutase (SODMn), an important antioxidant defense (Essers et al., 2004). More recently, FOXO1 was shown to serve vital functions in gonads and to contribute to oocyte maintenance in a functionally redundant manner in mammalian species (Tarnawa et al., 2013). In addition, the gene ephrin-A4 (*efNA4*) was overexpressed in fish from Gironde. The protein product of this gene binds to a membrane receptor inducing two parallel processes both of which result in the inhibition of the transcription factor FOXO1. The activation of the ephrin receptor will simultaneously induce IRS-1 (insulin receptor substrate 1) and RAS (G protein) both of which activate PI3K and inhibit FOXO1. Thus, several genes involved in signaling pathways that lead to FOXO1 inactivation were up-regulated in fish from Gironde. In contrast, the gene encoding FOXO1 was significantly up-regulated in eels from Gironde. It is important to keep in mind that the processes presented above are described at the protein level while the present study was done on mRNA. Quantification of the FOXO1 protein would provide further insight into why increased gene expression is occurring at the same time as an increase in the transcription level of genes involved in pathways that are known to trigger FOXO1 inactivation. Moreover, an increase in the transcription level of a gene encoding for a protein that activates FOXO1 was also observed. The gene coding for the protein COPS3 was overexpressed. This protein acts on the PI3K/Akt signaling process by

inhibiting Cullin2 which has among its roles to regulate the IRS1 protein by causing its ubiquitination and ultimately its degradation by the proteasome (Hartmann et al., 2013). The activation of this metabolic pathway can lead to activation of the FOXO1 transcription factor. We hypothesize that contamination disrupts many pathways implicated in the regulation of FOXO1 activity, and thus ultimately in defense mechanisms against oxidative stress, cell cycle arrest and energy metabolism regulation.

Sexual maturation could also be disrupted by contamination causing interference with sex hormone synthesis. One step in steroid hormone biosynthesis takes place in the mitochondrion, by the enzyme cytochrome P450_{scc} (also called CYP11A1). This enzyme (Fig. 3) converts cholesterol to pregnenolone which is rapidly transformed into progesterone (Tuckey et al., 2001), a precursor of estradiol. A gene involved in steroidogenesis and in the activity of cytochrome P450_{scc} was overexpressed in contaminated eels, the *ferredoxin mitochondrial* gene (*fdx1*). While FDX1 is known for its role in steroid hormone biosynthesis by participating in the reduction of the mitochondrial cytochrome P450, an excess of it in mitochondria will inhibit the cytochrome P450_{scc} activity. Tuckey et al., (2001) showed that in its oxidized form, *ferredoxin* inhibits the cytochrome P450_{scc} through competitive inhibition with cholesterol.

Conclusion

Among genes that were differentially regulated between fish from Certes and Gironde, genes which transcription levels were more associated with contaminants were involved in the protection against oxidative stress, DNA repair, in the purinergic pathway (control of the cell cycle) but also in steroid hormones synthesis and in oocyte maintenance. An effect of contaminants on such pathways in eel gonads could impair their development and ultimately, the reproductive capacity of animals. This study, with previous studies carried out on female silver eels (Palstra et al., 2006; Pierron et al., 2008; Pierron et al., 2009; see Geeraerts and Belpaire for review), corroborate the fact that contamination could contribute to the decline of the European eel by impairing their reproduction. As described by Geeraerts and Belpaire (2010), spawner quality might be a key element in the decline of the species.

Acknowledgements

We wish to acknowledge the contributions of our support staff, without whom this study could not have been completed. We would like to thank all the IRSTEA technical personnel, notably Charline Gesset, Louis Jacobs and Rémy Fraty, who participated in the experimental maturation study. Pierre Elie and Patrick Girard are thanked for their veterinary expertise. This work was supported by the Regional Council of Aquitaine, the Agence Nationale de la Recherche of France (ANR Immortel ANR-10-INTB-1704) and a Strategic Project Grant of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to Patrice Couture and Louis Bernatchez. This work was also supported by the Investments for the future Program, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45). Lucie Baillon was supported by a collaborative doctoral fellowship between the Université de Bordeaux (France) and Université Laval (Québec, Canada).

Figure captions

Fig. 1: Mean \pm SD of GSI of female silver eels from Certes and Gironde before (T0) and after (T11) hormonal treatment. Means designated with different letters are significantly different. Kruskal-Wallis test ($n=8$, except for Gironde T0 where $n = 5$, $P < 0.05$).

Fig. 2: Principal component analysis (PCA): (A) Relationships between the transcription level of the 17 genes that were differentially transcribed between fish from Certes and Gironde and organic contaminant or metal contents or fish GSI. Scores for the principal components 1 and 2 were 52.41% and 20.54% respectively. (B) Screening of animals from Certes and Gironde on the principal component 1 and 2. See text and Table 3 for more details.

Fig. 3: Schematic diagram presenting the possible biological pathways affected by contaminants in gonads of female European silver eel. (efNA4: Ephrin-A4, entpd8: Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 8, P2X/P2Y: purinergic receptor, Cops3: signalosome complex subunit 3, gdpbp1: GTP Binding Protein 1, IRS-1: Insulin Receptor Substrate 1, PI3K: phosphatidylinositol-3 kinase, PIP3: Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate, Akt: protein kinase B, foxo1: Forkhead box protein O1, fdx1: ferredoxin mitochondrial, fdx1, FDX1 red: reduced form of ferredoxin, FDX1ox: oxidized form of ferredoxin, CYP450scc: cytochrome P450scc).

Table 1: Morphometric parameters of female silver eels from Certes and Gironde before (T0) and after (T11) hormonal treatment. All data are expressed as means \pm SE (n = 8, except for Gironde T0 where n = 5). For each variable, means designated with different letters are significantly different (LSD test, $P < 0.05$).

	Certes	Gironde	Certes	Gironde
Weight (g)	279.8 \pm 20.0 ^{a,b}	284.3 \pm 18.4 ^{a,b}	315.9 \pm 31.9 ^a	237.4 \pm 22.8 ^b
Length (mm)	561.0 \pm 13.8 ^a	558.8 \pm 10.8 ^a	574.3 \pm 20.3 ^a	531.6 \pm 22.8 ^a
Gonad weight (g)	4.8 \pm 0.4 ^a	5.6 \pm 0.8 ^{a,b}	20.6 \pm 3.9 ^c	12.2 \pm 3.0 ^b
Fulton condition factor	0.157 \pm 0.004 ^a	0.162 \pm 0.007 ^a	0.163 \pm 0.003 ^a	0.154 \pm 0.007 ^a

Table 2: Mean persistent organic contaminants (POPs, expressed as ng, dw) and metals (expressed as µg, dw) contents in gonads of female European silver eels sampled in 2 sites (Certes and Gironde) after 11 weeks of hormonal treatment. All data are expressed as means \pm SE (n = 8 per site). For each variable, means designated with different letters are significantly different (ANOVA, $P < 0.05$). ND = Non-Detectable.

	Certes	Gironde
<i>Metals</i>		
Cr	10.32 \pm 0.75 ^a	6.94 \pm 0.81 ^a
Ni	37.79 \pm 2.25 ^a	34.38 \pm 4.48 ^a
Cu	41.5 \pm 2.56 ^a	22.77 \pm 2.14 ^b
Zn	2424 \pm 135 ^a	1565 \pm 129 ^b
As	11.92 \pm 0.55 ^a	7.93 \pm 0.48 ^a
Se	33.08 \pm 2.35 ^a	31.26 \pm 2.98 ^a
Ag	0.18 \pm 0.01 ^a	0.44 \pm 0.06 ^b
Cd	0.17 \pm 0.02 ^a	0.83 \pm 0.11 ^b
Pb	0.40 \pm 0.05 ^a	0.11 \pm 0.01 ^b
Hg	0.55 \pm 0.06 ^a	0.76 \pm 0.07 ^b
<i>POPs</i>		
HCB	34.73 \pm 2.82 ^a	34.60 \pm 4.34 ^a
Lindane	30.50 \pm 2.61 ^a	14.76 \pm 1.91 ^b
2,4'DDE	14.16 \pm 2.39 ^a	118.09 \pm 16.59 ^b
4,4'DDE+Dieldrin	78.00 \pm 9.42 ^a	1140.64 \pm 117.41 ^b
24DDD	2.06 \pm 0.13 ^a	27.38 \pm 2.19 ^b
4,4'DDD	49.31 \pm 6.98 ^a	490.02 \pm 51.88 ^b
2,4'DDT	2.06 \pm 0.13 ^a	0.1 \pm 0.078 ^b
44DDT	16.57 \pm 3.58 ^a	114.34 \pm 16.46 ^b
OCP_sum	239.3 \pm 24.4 ^a	1657.4 \pm 231.9 ^b
PBDE_sum	ND	209.69 \pm 21.61
PCB_sum	2065 \pm 231 ^a	15529 \pm 1433 ^b

Table 3: List of the genes that were differentially transcribed between eels from Certes and Gironde after 11 weeks of hormonal treatment. Results are presented as fold change as compared to eels from Certes. Analyses were carried out by means of the class comparison tool available in the BRB array tools software ($P < 0.01$).

Fold-change	Gene name	Symbol	Biological function
0.61	Golgi resident protein GCP60	<i>acbd3</i>	Steroid biosynthetic process, protein transport
0.59	Protein furry homolog	<i>fry</i>	Microtubule organization
1.47	Ephrin-A4	<i>efNA4</i>	Ephrin receptor signalling pathway
1.59	COP9 signalosome complex subunit 3	<i>cops3</i>	In utero embryonic development; signal transduction
1.47	Adrenodoxin, mitochondrial	<i>fdx1</i>	Steroid biosynthetic process; cholesterol metabolic process; hormone biosynthetic process
0.55	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase CYLD	<i>cylt</i>	Protein K63-linked deubiquitination; negative regulation of canonical Wnt receptor signaling pathway
0.54	Polyadenylate-binding protein 1	<i>pabpc1</i>	Gene silencing by RNA; positive regulation of nuclear-transcribed mRNA catabolic process
1.61	Ethanolamine-phosphate cytidylyltransferase	<i>pcyt2</i>	Biosynthetic process
0.69	Kinectin	<i>ktn1</i>	Microtubule-based movement; protein transport
1.45	GTP-binding protein 1	<i>gtpbp1</i>	GTP catabolic process
0.58	Prefoldin subunit 6	<i>pfdn6</i>	Protein folding; chaperone-mediated protein complex assembly
1.49	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 8	<i>entpd8</i>	Nucleoside monophosphate biosynthetic process
1.49	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like	<i>hnrnpl</i>	Positive regulation of RNA splicing
1.52	Phosphoserine aminotransferase	<i>psat1</i>	L-serine biosynthetic process
0.38	Nardilysin	<i>nrd1</i>	Proteolysis
1.85	Forkhead box protein O1	<i>foxo1</i>	Tissue development; regulation of cell proliferation; positive regulation of gluconeogenesis
0.56	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	<i>zc3h13</i>	/

Fig. 1

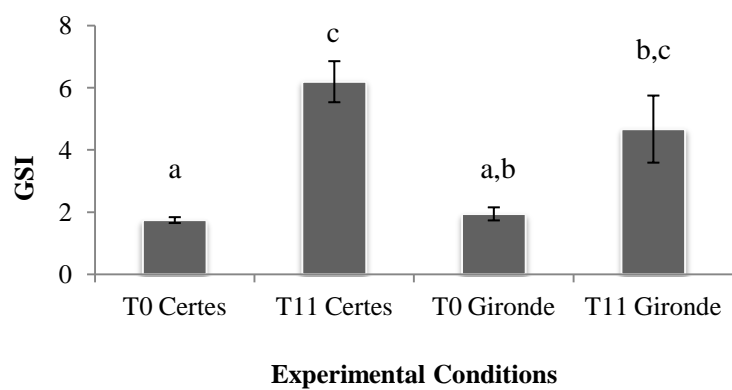


Fig 2

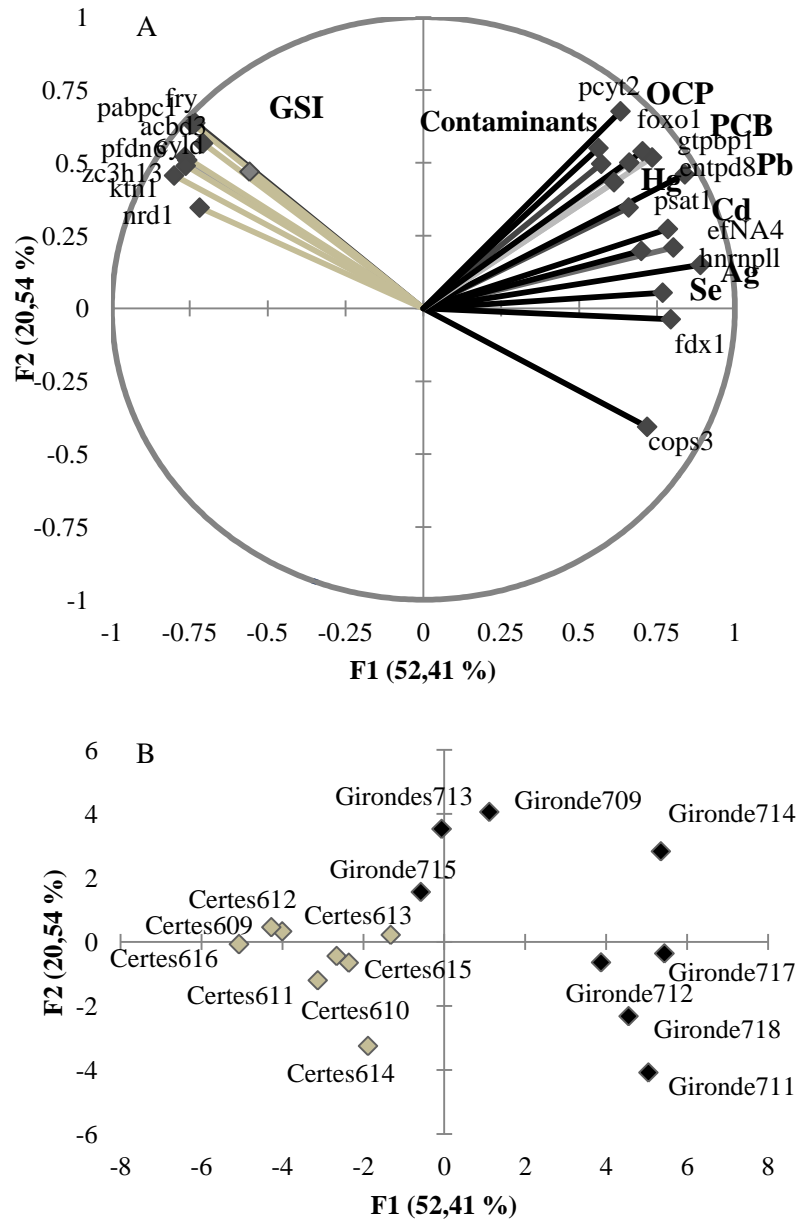
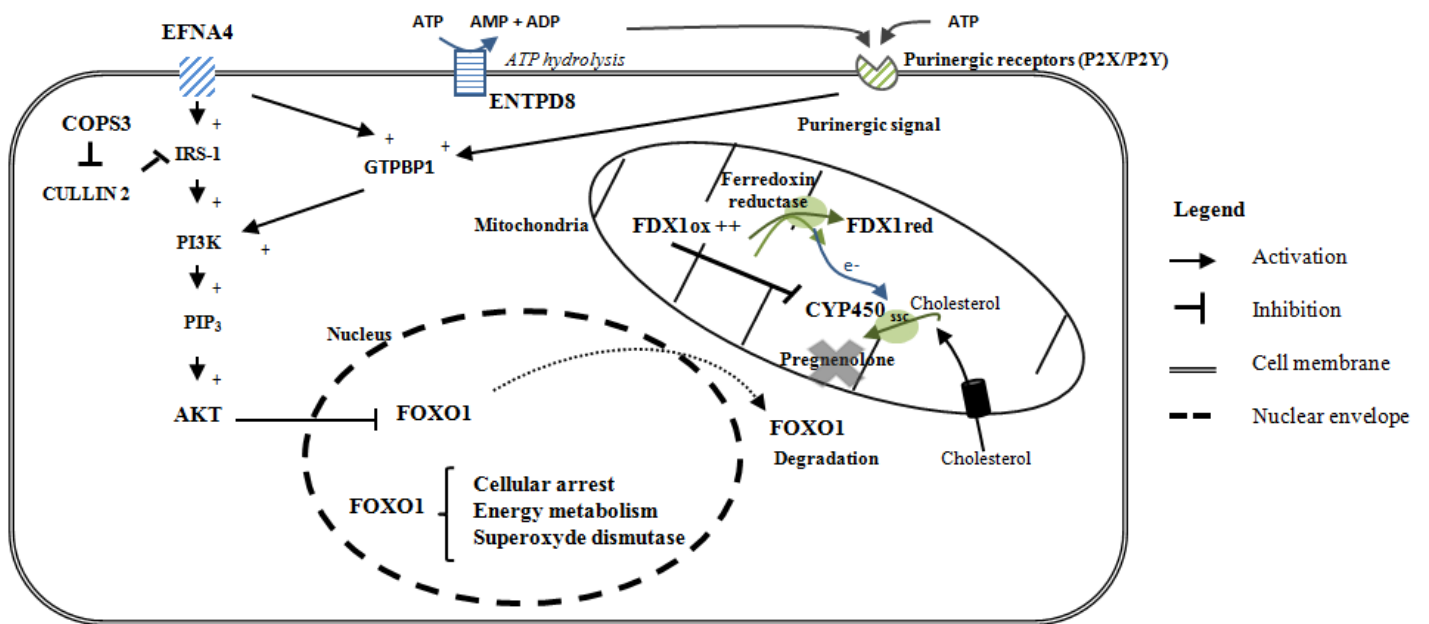


Fig. 3



References

- Bai, J.-Z., Mon, Y., Krissansen, G.W., 2006. Kinectin participates in microtubule-dependent hormone secretion in pancreatic islet b-cells. *Cell Biol. Int.* 30, 885-894.
- Baillon, L., Pierron, F., Coudret, R., Normandeau, E., Caron, A., Peluhet, L., Labadie, P., Budzinski, H., Durrieu, G., Sarraco, G., Elie, P., Couture, P., Baudrimont, M., Bernatchez, L., 2015. Transcriptome profile analysis reveals specific signatures of pollutants in Atlantic eels. *Ecotoxicology*. 24(1), 71-84.
- Burnstock, G., 2014. Purinergic signalling in endocrine organs. *Purinergic Signal*. 10, 189-231.
- Chiba, S., Ikeda, M., Katsunuma, K., Ohashi, K., Mizuno, K., 2009. MST2- and Furry-Mediated Activation of NDR1 Kinase Is Critical for Precise Alignment of Mitotic Chromosomes. *Curr. Biol*. 19, 675–681.
- Davidsen, J.G., Finstad, B., Økland, F., Thorstad, E. B., Mo, T. A., Rikardsen, A. H., 2011. Early marine migration of European silver eel (*Anguilla anguilla*) in Northern Norway. *J. Fish Biol.* 78, 1390-1404.
- Durif C., Dufour S., Elie P., 2006. Impact of silvering stage, body size and condition on reproduction potential of the European eel. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 327, 171-181.
- Durrieu, G., Maury-Brachet, R., Girardin, M., 2005. Contamination by heavy metals (Cd, Zn, Cu, and Hg) of eight fish species in the Gironde estuary (France). *Estuaries* 28(4), 581-591.
- Essers, M.A.G., Weijzen, S., de Vries-Smits, A.M.M., Saarloos, I., de Ruiter, N.D., Bos, J.L., Burgering, B.M.T., 2004. FOXO transcription factor activation by oxydative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *EMBO J.* 23, 4802-4812.
- Fan, J., Liu, J., Culty, M., Papadopoulos, V., 2010. Acyl-coenzyme A binding domain containing 3 (ACBD3; PAP7; GCP60): An emerging signaling molecule. *Prog. Lipid Res.* 49, 218-234.
- Geeraerts, C., Belpaire, C., 2009. The effects of contaminants in European eel: a review. *Ecotoxicology* 19(2), 239-66.
- Han, N., Li, W., Zhang, M., 2013. The function of the RNA-binding protein hnRNP in cancer metastasis. *J. Cancer Res. Ther.* 9, 129-134.
- Hartmann, T., Xu, X., Kronast, M., Muehlich, S., Meyer, K., Zimmermann, W., Hurwitz, Z., Pan, Z.-Q., Engelhardt, S., Sarikas, A., 2013. Inhibition of Cullin-RING E3 ubiquitin ligase 7 by simian virus 40 large T antigen. *PNAS* 111, 3371-3376.
- ICES (2013) Report of the Joint EIFAAC/ICES Working Group on Eels (WGEEL), 18–22 March 2013 in Sukarietta, Spain, 4–10 September 2013 in Copenhagen, Denmark. ICES CM 2013/ACOM: 18. 851 pp.

- Kojima, S., Takai, E., Tsukimoto, M., 2011. ATP released from low-dose Gamma Ray-irradiated Cells Activates Intracellular Antioxydant Systems via Purine Receptors. *Anti-Aging Medicine* 7, 108-113.
- Labadie, P., Alliot, F., Bourges, C., Desportes, A., Chevreuil, M., 2010. Determination of polybrominated diphenyl ethers in fish tissues by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry: Case study on European eel (*Anguilla anguilla*) from Mediterranean coastal lagoons. *Anal. Chim. Acta.* 675 (2), 97-105.
- Lanceleur, L., Schäfer, J., Blanc, G., Coynel, A., Bossy, C., Baudrimont, M., Glé, C., Larrose, A., Renault, S., Strady, E., 2013. Silver behavior along the salinity gradient of the Gironde Estuary. *ESPR.* 20(3), 1352-1366.
- Lundin, V.F., Srayko, M., Hyman, A.A., Leroux, M.R., 2008. Efficient chaperone-mediated tubulin biogenesis is essential for cell division and cell migration in *C. elegans*. *Dev. Biol.* 313, 320-334.
- Ozturk, S., Yaba-Ucar, A., Sozen, B., Mutlu, D., Demir N., 2014. Superovulation alters embryonic poly(A)-binding protein (Epab) and poly(A)-binding protein, cytoplasmic 1 (Pabpc1) gene expression in mouse oocytes and early embryos. *Reprod. Fertil. Dev.*
- Ozturk, S., Guzeloglu-Kayisli, O., Demir, N., Sozen, B., Ilbay, O., Laloti, M.D., Seli, E., 2012. Epab and Pabpc1 Are Differentially Expressed During Male Germ Cell Development. *Reprod. Scis.* 19(9), 911-922.
- Palstra, A. P., van Ginneken, V. J. T., Murk, A.J., van den Thillart, G. E. E. J. M., 2006. Are dioxin-like contaminants responsible for the eel (*Anguilla anguilla*) drama? *Naturwissenschaften* 93 (3), 145-148.
- Pavlovic, Z., Bakovic, M., 2013. Regulation of phosphatidylethanolamine Homeostasis – The critical Role of CTP : Phosphoethanolamine Cytidyltransferase (Pcyt2). *Int. J. Mol. Sci.* 14, 2529-2550.
- Pierron, F., Baudrimont, M., Dufour, S., Elie, P., Bossy, A., Baloché, S., Mesmer-Dudons, N., Gonzalez, P., Bourdineaud, J-P., Massabuau, J-C., 2008. How cadmium could compromise the completion of the European eel's reproductive migration. *Environ. Sci. Technol.* 42 (12), 4607-4612.
- Pierron, F., Baudrimont, M., Dufour, S., Elie, P., Bossy, A., Lucia, M., Massabuau J.-C., 2009. Ovarian gene expression and effect of cadmium pre-exposure during artificial sexual maturation of the European eel (*Anguilla anguilla*). *Biometals*, 22(6), 985-994.
- Riggio, M., Filosa, S., Parisi, E., Scudiero, R., 2003. Changes in zinc, copper and metallothionein contents during oocyte growth and early development of the teleost *Danio rerio* (zebrafish). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 135(2), 191-196.

- Robinet T., Feunteun E., 2002. Sublethal effects of exposure to chemical compounds: A cause for the decline in Atlantic eels? *Ecotoxicology* 11, 265-277.
- Roy, K.S., Srivastava, R.K., Shankar, S., 2010. Inhibition of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways causes activation of FOXO transcription factor, leading to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer. *J. Mol. Signal.* 5, 10.
- Stone, R., 2003. Freshwater eels are slip-sliding away. *Science* 302 (5643), 221-222.
- Tapie, N., Budzinski, H, Le Ménach, K., 2008. Fast and efficient extraction methods for the analysis of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in biological matrices. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 2169-2177.
- Tapie, N., Le Menach, K., Pasquaud, S., Elie, P., Devier, M.H., Budzinski, H., 2011. PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary: From glass eels to silver eels. *Chemosphere* 83, 175-85.
- Tarnawa, E.D., Baker, M.D., Aloisio, G.M., Carr, B.R., Castrillon, D.H., 2013. Gonadal expression of Foxo1, but not Foxo3, is conserved in diverse Mammalian species. *Biol Reprod.*, 88(4):103
- Tesch F., 2003. The eel. Edition blackwell publishing, fifth edition, 1-408.
- Toyama, A., Suzuki, A., Shimada, T., Aoki, C., Aoki, Yutaka, Umino, Y., Nakamura, Y., Aoki, D., Sato, T.-A., 2012. Proteomic characterization of ovarian cancers identifying annexin-A4, phosphoserine aminotransferase, cellular retinoic acid-binding protein 2, and serpin B5 as histology-specific biomarkers. *Cancer Sci.* 103, 747-755.
- Tsichritzis, T., Gaentzsch, P.C., Kosmidis, S.K., Brown, A.E., Skoulakis, E.M., Ligoxygakis, P., Mosialos G., 2007. A Drosophila ortholog of the human cylindromatosis tumor suppressor gene regulates triglyceride content and antibacterial defense. *Development.* 134, 2605-2614.
- Tuckey, R.C., McKinley, A.J., Headlam, M.J., 2001. Oxidized adrenodoxin acts as a competitive inhibitor of cytochrome P450_{scc} in mitochondria from the human placenta. *Eur. J. Biochem.* 268, 2338-2343.
- van Ginneken, V., J., T., Maes G. E., 2005. The European eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus), its Lifecycle, Evolution and Reproduction: A Literature Review. *Rev. Fish. Biol. Fisher.* 15 (4), 367-398.
- Vidal, B., Pasqualini, C., Le Belle, N., Holland, M.C.H., Sbaihi, M., Vernier, P., Zohar, Y., Dufour, S., 2004. Dopamine inhibits luteinizing hormone synthesis and release in the juvenile European eel: a neuroendocrine lock for the onset of puberty. *Biol. Reprod.* 71, 1491-1500.
- Vizeacoumar, F.J., Arnold, R., Vizeacoumar, F.S., Chandrashekhar, M., Buzina, A., Young, J.T.F., et al., 2013. A negative genetic interaction map in isogenic cancer cell lines reveals cancer cell vulnerabilities. *Mol. Syst. Biol.* 9, 696.

3. Conclusion

Après différentes approches dédiées à la compréhension des effets propres des polluants sur les anguilles sauvages, nous avons utilisé la puce à ADN pour appréhender l'impact possible des contaminants sur les capacités de reproduction de l'anguille, notre modèle d'étude, dont la menace d'extinction est aujourd'hui bien réelle.

Dans ce but, des anguilles femelles au stade argenté ont été prélevées sur deux sites, à Certes, un site de référence et dans l'estuaire de la Gironde, le site considéré comme le plus contaminé. Après 11 semaines de maturation artificielle en laboratoire, une bioaccumulation notable de métaux non-essentiels a été observée dans les gonades des anguilles de Gironde et au contraire dans les anguilles de Certes, une accumulation importante d'éléments essentiels comme le sélénium, le cuivre ou le zinc a été observée. En outre de plus fortes teneurs en contaminants organiques ont été observées dans les gonades des anguilles de Gironde comparativement aux anguilles provenant de Certes. L'utilisation de la puce ADN sur des échantillons de gonades a mis en évidence différents profils de transcription entre les anguilles provenant d'un site propre et contaminé. Une analyse en composante principale a permis d'identifier deux groupes de gènes, l'un associé à l'indice gonado-somatique (GSI) et l'autre associé aux contaminants présents dans les gonades. Parmi les gènes associés aux contaminants, le changement d'expression de gènes impliqués dans la voie de signalisation purinergique, voie impliquée dans la détection du stress via l'ATP extracellulaire, a été mis en évidence. Outre la voie de signalisation purinergique, d'autres voies de signalisation également impliquées dans la voie activant le facteur de transcription FOXO1 semblaient être affectés par les polluants. La perturbation de ces cascades d'activation pourrait compromettre les processus de défense contre le stress oxydant, l'arrêt du cycle cellulaire ou encore la régulation du métabolisme énergétique. Enfin, une possible surproduction d'adrénodoxine dans la mitochondrie pourrait inhiber via le cytochrome P450_{scc}, la synthèse d'hormones sexuelles compromettant ainsi la croissance des gonades. En accord avec ces résultats d'expression, une croissance moindre des gonades des individus de la Gironde a été observée par rapport aux individus de Certes. Cette étude, en accord avec les travaux de Palstra et al., 2006 et de Pierron et al., 2008 et 2009, semble montrer que la pollution pourrait compromettre la capacité de reproduction des futurs géniteurs d'une part et la viabilité de la descendance d'autre part et contribuer alors à l'effondrement de cette espèce observé depuis trois décennies.

Chapitre 7

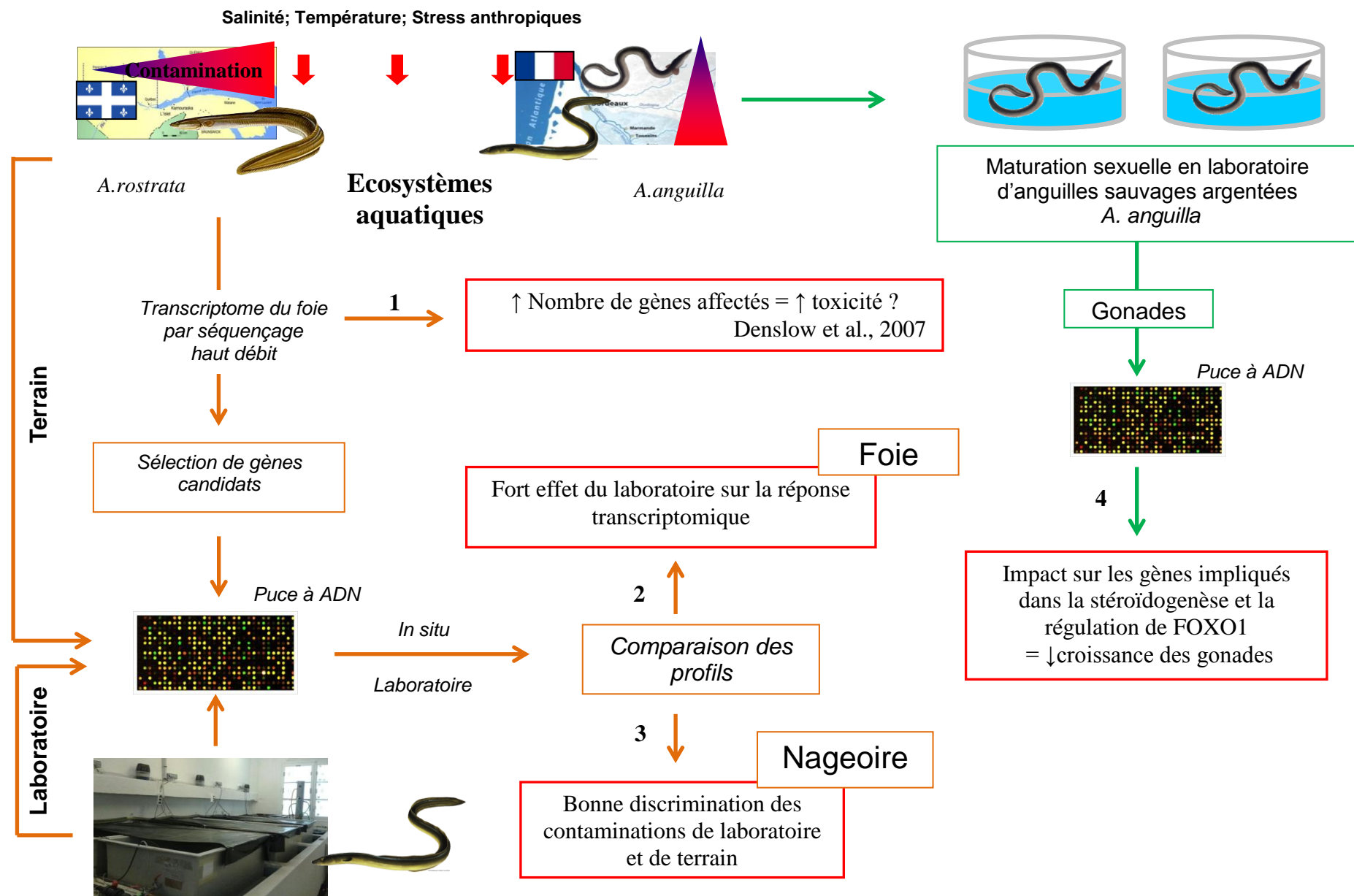
Discussion et perspectives

Préambule

Les écosystèmes aquatiques sont soumis à une large gamme de facteurs abiotiques. Les estuaires en particulier sont alimentés en eau douce par leurs affluents en amont et en eaux salines en aval par la remontée de l'océan dans les zones côtières, remontant en Gironde jusqu'à 150 km en amont de l'embouchure. A cela s'ajoute une variation de la température au cours de ce mélange des eaux. Les espèces aquatiques vivant dans un tel milieu sont par conséquent soumises aux changements de salinité et de température d'amont en aval de l'estuaire, les contraignant à coloniser un milieu propice à leur physiologie, où à s'adapter aux variations physico-chimiques auxquelles elles sont soumises. En outre, l'impact de l'activité humaine a conduit à la réduction des territoires et à l'émission de polluants qui se sont largement accumulés au sein de ces systèmes et des organismes.

La question qui a amené à réaliser les travaux présentés dans cette thèse était de savoir s'il était possible de détecter et démêler les effets de chaque contaminant présent en mélange dans ces systèmes aquatiques et de les dissocier des effets des facteurs naturels au niveau de la transcription des gènes des organismes. L'anguille, du fait de sa capacité exceptionnelle à s'adapter à son environnement, a su coloniser une large gamme de milieux. De plus, son mode de vie benthique et sa place dans la chaîne alimentaire permettent de prendre en compte les différentes voies de contamination, rendant cette espèce pertinente pour répondre à la question soulevée. En outre, pour tenter de répondre à cette interrogation nous avons utilisé deux approches transcriptomiques, le séquençage haut débit et la puce à ADN.

L'ensemble des travaux menés au cours de cette thèse sont résumés en figure 7.1.



Hg; Cd; pesticides; PCB;
Température: Salinité

Figure 7.1 : Synthèse des résultats des travaux réalisés dans cette thèse

1. Discussion générale

1.1 Approche anguille jaune

Le premier travail de cette thèse était de relier sans *a priori* des gènes à un facteur anthropogénique ou naturel et de leur attribuer à chacun une « signature » spécifique à partir d'animaux prélevés en milieu naturel. Le résultat le plus marquant était dans le nombre de gènes associés à chaque facteur qui n'était pas proportionnel à la concentration retrouvée dans les organismes échantillonnés. En effet, si le Cd a été associé à un grand nombre de gènes du fait de sa forte teneur mesurée dans les anguilles dans notre étude, l'arsenic a, quant à lui, été associé à un pourcentage similaire, pourtant marqué par un faible gradient de concentration entre les sites de l'étude. La même tendance a été observée pour le lindane qui a été relié avec le plus grand nombre de gènes de l'ensemble des facteurs testés. Notons de plus que sa contribution à la concentration totale des organochlorés était de l'ordre de 2% en moyenne par site. En toxicologie et en écotoxicologie, l'estimation des risques d'un contaminant pour un organisme est déterminée au travers de tests communément basés sur le concept de la dose-réponse permettant de déterminer les seuils de concentration où aucun effet n'est observé (McCarty et Mackay, 1993). Cependant, ce principe de la dose-réponse est controversé et de nouveaux concepts sont avancés notamment par le modèle du « seuil » où des réponses peuvent être mesurées à très faible doses, soit en dessous des concentrations NOAEL (No observed adverse effect level) (Calabrese et Baldwin, 2002). Au regard de la LC50 (concentration pour laquelle 50% de mortalité est observée) pour le lindane et les PCBs chez la perchaude (*Perca flavescens*) (source US National Library of Medicine ; <http://webwiser.nlm.nih.gov/>), le lindane est 5 fois plus toxique que les PCBs en contamination directe. Au niveau des réponses transcriptomiques, les PCBs sont associés à 1% des gènes contre 12% pour le lindane ce qui pourrait être en accord avec leur toxicité respective. Cette observation pourrait s'accorder avec les travaux de Denslow et al. 2007. Ces auteurs proposent en effet un continuum des réponses transcriptomiques où le nombre de gènes transcrits augmente avec l'effet toxique des contaminants (dose et temps). La quantification du nombre de gènes différemment transcrits pourrait être ainsi utilisée pour évaluer la toxicité d'une substance et d'en prédire les effets néfastes sur l'individu. Ce résultat relate en outre l'évidence d'un effet non négligeable au niveau de la transcription des gènes même à très faibles doses d'un contaminant. Cela remet en question l'utilisation en laboratoire de doses parfois irréalistes par rapport au milieu naturel pour évaluer les effets

toxiques d'une substance sur un organisme, où l'interprétation des résultats serait difficilement applicable sur le terrain.

L'étude réalisée au moyen de la puce à ADN sur le foie des deux espèces d'anguilles d'Atlantique échantillonnées dans leur environnement naturel et des anguilles Européennes exposées à différents facteurs environnementaux en laboratoire a donné deux résultats majeurs (*chapitre 4*). Le premier était le constat d'une séparation notable des profils établis sur les animaux exposés en laboratoire et ceux établis sur les individus sauvages. Les gènes différenciellement transcrits entre les conditions en laboratoire et de terrain ont mis en avant l'influence possible du stress de la captivité des animaux maintenus en aquarium sur le système immunitaire et la croissance des individus. En effet, les contraintes techniques du laboratoire engendrent des biais dans les réponses des animaux, soumis non seulement au stress fixé par l'expérimentateur, mais aussi aux stress endogènes à l'expérimentation elle-même. Les anguilles, au stade jaune, ont un comportement plutôt solitaire en milieu naturel et l'influence d'un environnement restreint avec plusieurs congénères pourrait « masquer » les effets propres au stress initialement testé. Néanmoins, il est important de souligner que si les effets du stress du confinement sont relativement bien marqués au niveau du foie par une augmentation du cortisol dans les premiers jours suivants le stress du confinement (Vijayan et al., 1997), une étude a montré que le niveau de cortisol retourne à son niveau basal après plusieurs jours suivant le stress (Trenzado et al., 2003). Plus récemment une étude s'est intéressée à la dynamique de la réponse au niveau de l'expression des gènes hépatiques (mesurée au moyen d'une puce à ADN) sur des poissons soumis à un stress de confinement en aquarium pendant 120 h. L'expérience a montré que la réponse au stress est complexe et varie dépendamment du temps (Calduch-Giner et al., 2010). Selon les auteurs, la réponse serait divisée en trois phases : précoce, différée et adaptative. Ces phases correspondraient à un ajustement spécifique des cellules donnant lieu à i) un approvisionnement rapide de l'énergie, ii) un remodelage des processus biologiques et de réparation tissulaire, iii) un rétablissement de l'homéostasie. Bien que ces travaux soient difficilement assimilables à la présente étude, du fait que les anguilles aient été maintenues sur une plus longue période en aquarium (supérieure à 45 jours), la séparation notable des anguilles de laboratoire à celle du terrain laisse supposer un impact possible de la captivité sur les réponses transcriptomiques. Aussi pouvons-nous nous demander, au vu de l'influence du stress sur l'expression des gènes, si le foie représente un organe pertinent pour discriminer les effets de chaque facteur en milieu naturel ?

Cependant, il est nécessaire de rappeler que la confrontation des profils établis au niveau du foie avait permis toutefois de regrouper quatre des cinq animaux de la contamination aux PCB à 50 ng.g^{-1} (concentration basse) avec des individus provenant des sites Saint-François et Saint-Pierre dont les concentrations en PCBs dans le muscle étaient proches de celles mesurées dans les individus expérimentaux. Aussi pourrait-on conclure que le foie permet de discriminer efficacement une contamination en condition naturelle lorsque cette dernière est similaire dans les tissus des animaux expérimentaux et sauvages ? La réponse demeure difficile à donner. En effet, la nature organique des PCBs fait que ces derniers peuvent se bioaccumuler le long de la chaîne alimentaire (Porte et Albaigés, 1993 ; Letcher et al., 1998). Les facteurs de bioconcentration (BCF) très élevés des PCBs (BCF= 68000 ; Nendza et al., 1997) dans la chaîne trophique font que les espèces situées en fin de chaîne peuvent ainsi atteindre des teneurs importantes de ces contaminants dans leurs organes les plus lipophiles comme le muscle dans le cas de l'anguille. Dans notre expérience, nous avons choisi des teneurs en PCBs dans la nourriture similaires à celles mesurées dans les proies des anguilles en Gironde afin d'être au plus proche des conditions environnementales. Au bout de 45 jours d'exposition aux PCBs par la voie trophique, une bioaccumulation moindre comparée aux anguilles de Gironde ou de Garonne avait été observée : $170 \pm 2,67 \text{ ng.g}^{-1}$, $1587 \pm 53,7 \text{ ng.g}^{-1}$ et $1712,45 \pm 0,24 \text{ ng.g}^{-1}$ pour la condition de laboratoire, la Garonne et la Gironde respectivement reflétant ainsi la difficulté majeure à reproduire la complexité des expositions en milieu naturel tant par la concentration que le temps d'exposition. Si l'on regarde également l'âge des anguilles de l'estuaire du Saint-Laurent et de la Gironde, les anguilles Américaines étaient deux fois plus âgées que les anguilles Européennes ($14 \pm 2,13$ ans et $7 \pm 0,8$ ans respectivement). Les anguilles Américaines ont probablement été ainsi en contact plus longtemps avec les contaminants de leur milieu que les anguilles Européennes dans notre étude. Au vu des différences de concentrations en PCBs observées dans les muscles des anguilles de Saint-Pierre et Saint-François ($99,2 \pm 33,28$ et $67,64 \pm 5,5 \text{ ng.g}^{-1}$, respectivement) comparées à celle mesurées en Garonne et Gironde, la contamination de la chaîne trophique dans les rivières du Saint-Laurent semble être bien moins importante qu'en Gironde. La réponse transcriptomique des anguilles soumises à une exposition aux PCBs en condition de laboratoire, semble alors plus refléter une longue contamination mais à très faible concentration de ces derniers dans l'environnement. En d'autres termes, la pression expérimentale exercée par une contamination forte (contamination de la Gironde) et sur une courte période (45 jours) reflèterait la pression environnementale exercée au long terme par de très faibles concentrations de ce contaminant dans la chaîne trophique. Il faut néanmoins

modérer ce propos du fait qu'en expérimental la nourriture était contaminée artificiellement à partir d'un broyat de chair de poissons donc sans biotransformation potentielle dans les organismes proies qui pourraient en modifier la biodisponibilité ou la toxicité par exemple (Buckman et al., 2006). De plus, la nourriture était faite à partir d'une seule espèce de poisson et les anguilles ont été nourries *ad libitum*, ne reflétant alors pas le régime alimentaire réel des anguilles et pouvant modifier leur métabolisme ou leur croissance (Boisclair et Leggett, 1989).

L'étude de l'expression des gènes mesurés dans la nageoire caudale (*Cf chapitre 5*) des anguilles jaunes expérimentales et de terrain a permis de relier deux conditions expérimentales (Cd et PCB) avec les animaux provenant de l'estuaire de la Gironde. La nageoire offrirait ainsi une bonne discrimination des différentes conditions testées. Les concentrations des expositions ayant été fixées à des niveaux retrouvés dans les milieux naturels ajoute un argument en faveur de l'utilisation pertinente de la nageoire en écotoxicologie.

Par ailleurs il est important de noter que les gènes sélectionnés pour la construction de la puce à ADN ont été choisis à partir des niveaux de réponse issus du foie. La nageoire n'étant pas un organe central dans le métabolisme général des organismes, certains gènes exprimés dans le foie ne sont probablement pas ou peu exprimés dans cet organe plus « neutre » métaboliquement, induisant alors une réponse très différente entre ces deux tissus. Il semblerait en outre que l'expression des gènes soit moins « affectée » par le stress de l'expérimentation elle-même et reflèterait d'avantage l'influence des facteurs testés. La nageoire pourrait alors représenter un organe pertinent pour discriminer plus finement les effets de chaque facteur. Néanmoins la similarité des profils établis sur le foie des anguilles exposées aux PCB à 50 ng.g⁻¹ et des anguilles de terrain n'est pas à négliger. De plus, l'étude sur la nageoire s'est restreinte à un faible nombre de conditions contrairement au foie favorisant la liaison d'un profil de laboratoire avec un profil de terrain. L'utilisation conjointe des deux organes à ce stade des connaissances reste alors primordiale.

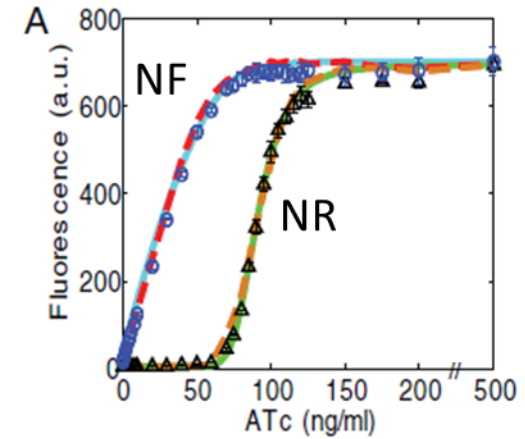
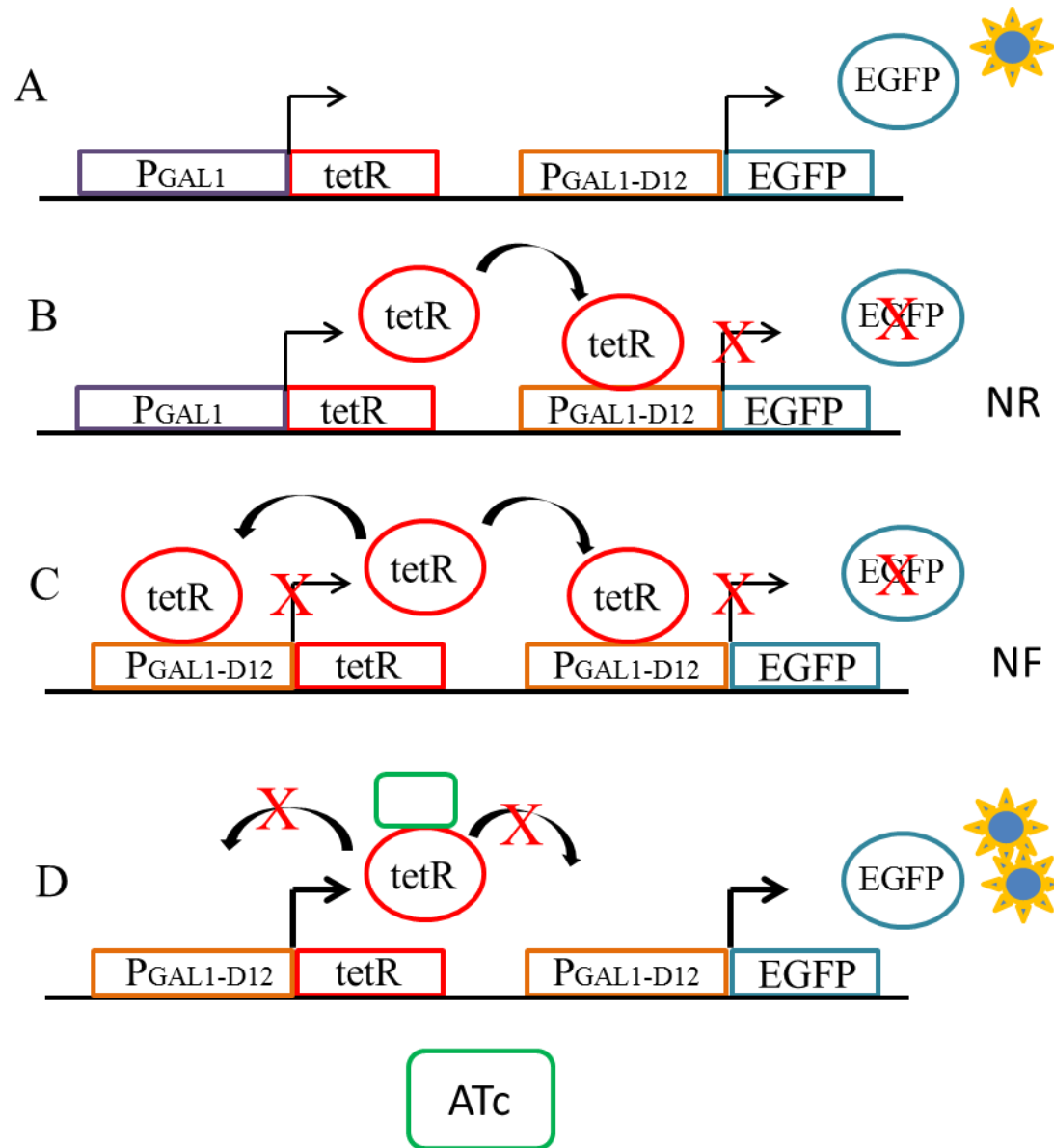
Une observation intéressante relevée au cours de ces travaux est l'influence notable du temps. Le temps est l'un des paramètres majeurs dans la contamination des organismes terrestres et aquatiques. En effet, Greenfield et al. en 2005 ont mis en évidence des variations de contamination inter-saisonnières, interannuelles mais également sur deux décennies dans différents poissons de la baie de San Francisco. Ces variations au cours des années seraient notamment dues aux changements d'utilisation de certains produits contaminants, modifiant ainsi les tendances de contamination dans le temps. Ainsi, bien que les mesures d'expression

des gènes soient à un instant t , à un moment particulier dans l'histoire de vie de l'individu, l'historique de contamination d'un individu qui a évolué dans un environnement contaminé va probablement influencer la réponse mesurée à cet instant t . La comparaison des profils transcriptomiques établis pour un contaminant à partir des données du RNA-seq (individus de terrain) et des puces à ADN (individus exposés en laboratoire) n'a donné par exemple que cinq et six gènes en communs dans les profils établis pour le Cd et les PCBs, respectivement (données non présentées). Le fait qu'un très faible nombre de gènes soient communs entre les profils établis sur des animaux de terrain et expérimentaux pourrait souligner une réponse très différente des individus soumis à un stress sur un temps court ou long. En plus d'un effet lié à la captivité (discuté plus haut), la séparation des individus sauvages et exposés en laboratoire pourrait également être le fait d'une réponse différente à une contamination chronique (long terme) ou aiguë (court terme). L'hypothèse qui pourrait être posée serait que dans le cas d'une forte contamination multiple et longue (plusieurs années), les individus auraient une réponse plus générale à la pollution et non particulière au contaminant le plus présent et « toxique » dans l'environnement. Une réponse qui pourrait étayer cette hypothèse serait le lien établi entre le profil d'expression de gènes des individus exposés à une température froide et des individus provenant des sites « contaminés » (Dordogne, Garonne, Gironde et Saint-Pierre). Les gènes communément retrouvés dans l'ensemble de ses profils sont impliqués dans des mécanismes épigénétiques. Ces mécanismes sont des modifications au niveau des histones ou de l'ADN qui peuvent modifier l'expression des gènes sans changer l'information génétique (Wolffe and Guschin, 2000 ; Bollati et Baccarelli, 2010). Ces mécanismes peuvent être influencés par les facteurs environnementaux, dont les polluants, et aboutir à un nouveau phénotype cellulaire (Baccarelli et Bollati, 2009). La réponse similaire d'individus exposés à des contaminants multiples ou à une température froide décrite en chapitre 4 (changement de l'utilisation des réserves énergétiques dans la cellule notamment) pourrait alors être le résultat d'un changement profond du phénotype cellulaire pour survivre dans un environnement pollué. L'implication de gènes liés à l'épigénétique communément retrouvés dans le foie et la nageoire chez les individus exposés au Cd en laboratoire (chapitre 5) sous-tendrait une induction de mécanismes épigénétiques différents à court et long terme ou un effet particulier de ce métal sur ces mécanismes. En effet, Baccarelli et Bollati en 2009 ont réalisé une synthèse des effets sur les mécanismes épigénétiques de contaminants métalliques et organiques. Cette étude montre que le Cd a une influence sur la méthylation globale de l'ADN comparativement à d'autres contaminants dont les effets sont plus ciblés sur un gène particulier. Les travaux de Pierron et al., 2014 ont également montré une hyperméthylation de

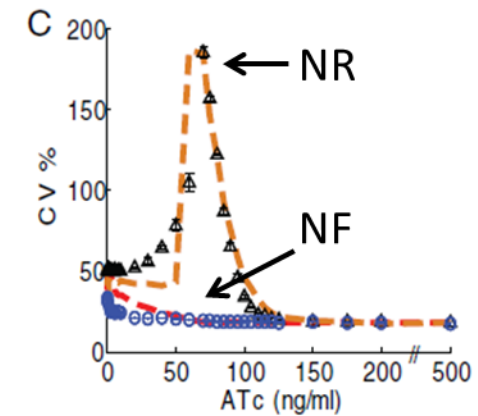
l'ADN d'anguilles immatures exposées au Cd pendant 45 jours. Il ne faut cependant pas omettre que les anguilles de laboratoire avaient été initialement prélevées sur le site de Certes, le site référence de l'étude. Ces animaux, au moment de l'échantillonnage, avaient alors un « passé » transcriptomique propre à leur histoire de vie. Ces traits de vie auraient pu influencer les réponses transcriptomiques observées en laboratoire, dont les réponses épigénétiques.

Un dernier résultat marquant était les différences des réponses observées entre les individus issus d'un même site ou d'une même contamination en laboratoire. Il semble en effet, que les individus exposés à de fortes concentrations (sites les plus contaminés et la condition PCB_50 (les anguilles exposées à 300 ng.g⁻¹ de PCB n'avaient pas montré d'accumulation notable) et à température faible notamment présentent une réponse transcriptomique plus homogène. Cette homogénéité est marquée par un lien hiérarchique fort entre ces deux facteurs dans les dendrogrammes. A contrario, une réponse plus hétérogène a été observée chez les individus témoins ou les PCB_300 par exemple. Il semblerait alors que les individus convergent vers une même réponse dans un scénario où la contamination est élevée. Autrement dit une contamination forte effacerait une partie de la variabilité interindividuelle existante et « forcerait » les organismes à « exprimer » une réponse commune pour endurer la contamination. La force de cette étude consistant à travailler, en partie, au niveau individuel a permis de souligner l'importance de la variabilité entre les individus à répondre à une perturbation. Cette variabilité de transcription des gènes est appelée « bruit d'expression génétique » (ou *gene expression noise* » en anglais). En écotoxicologie, la réponse est plus souvent mesurée à partir de la moyenne plus ou moins son écartype. Cette réponse moyennée est ensuite comparée à une autre moyenne issue d'une autre condition. Cette vision efface alors ces fluctuations de réponse qui pourtant pourraient représenter une part non négligeable de la réponse des individus à une contamination (Devin et al., 2014). Si une faible contamination semble ne pas effacer l'hétérogénéité des individus, quels mécanismes pourraient conduire à une réponse plus homogène des individus exposés à plus fortes doses ? Une réponse pourrait être apportée avec le modèle de l'« autorégulation négative » (ou « *negative feedback* » ; *NF*) développé par Nevozhay et al., 2009. Ce concept est basé sur des travaux au cours desquels des levures *Saccharomyces cerevisiae* ont été modifiées génétiquement. Ces dernières présentaient différentes constructions génétiques associant un promoteur (P_{Gal1-D12}) à gène rapporteur (*yEGPF*) et plus en amont un gène répresseur (*tetR*), ce dernier étant lui-même associé ou non à la même région promotrice (P_{Gal1-D12} ou P_{Gal1}) que celle utilisée en amont du gène rapporteur (Fig 7.2 A et B). La fixation

de la protéine tetR sur la région promotrice ($P_{Gal1-D12}$) empêche l'expression du gène adjacent, aucune fluorescence est alors émise (Fig 7.2 B). Si le gène tetR possède la même région promotrice $P_{Gal1-D12}$, la protéine tetR va se fixer alors sur cette région et va inhiber l'expression du gène rapporteur mais aussi celle du gène tetR, c'est l'autorégulation négative (NF). L'introduction d'une molécule extracellulaire, ici l'anhydrotétracycline (ATc) empêche la fixation de la protéine tetR sur la région promotrice ($P_{Gal1-D12}$), (tetR) (Fig. 7.2 D). L'ATc permet ainsi de lever l'inhibition engendrée par la protéine tetR et permet la transcription du gène. La transcription du gène rapporteur est mesurée par fluorescence en fonction de la concentration en ATc dans le milieu. En absence en amont du gène tetR d'une région promotrice permettant l'autorégulation négative de ce gène répresseur, la courbe de la réponse du gène *yEGFP* en fonction de la concentration en ATc est sigmoïdale. L'apport d'un promoteur introduisant la NF linéarise alors la réponse quelle que soit la dose en ATc, diminuant ainsi les fluctuations ou « bruit » des réponses. Ce mécanisme permettrait une réponse plus rapide des gènes (Rosenfeld et al., 2002) et réduirait également le coût métabolique dans la synthèse des protéines via la réduction de l'utilisation des ARNm (Stekel et Jenkins, 2008). Adapté à notre étude, l'ATc pourrait être un polluant et le gène tetR pourrait coder pour un facteur de transcription répresseur (ou co-répresseur), facteurs fréquemment retrouvés différentiellement transcrits dans l'ensemble des travaux de cette thèse, sous l'influence de contaminants. Parmi ces co-répresseurs, les gènes *C-terminal binding protein 2 gene (ctbp2)* (Baillon et al., sous presse ; Chapitre 3), *arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein* et *forkhead box protein N3* (Chapitre 4) étaient retrouvés sur-exprimés chez les anguilles prélevées sur le terrain.



Mesure de la fluorescence en fonction de la concentration en ATc selon le modèle NR ou NF



Mesure de la variabilité en fonction de la concentration en ATc selon le modèle NR ou NF

Figure 7.2 : Modèle de l'autorégulation négative, modifié à partir de Nevozhay et al., 2009.

Une exposition au long terme à un ou plusieurs contaminants, pourrait induire un tel système, diminuant alors la variabilité entre les individus. La réduction en outre du coût métabolique dans ce processus pourrait être reliée au résultat présenté en chapitre 4. Les individus exposés à une faible température et associés aux individus les plus contaminés semblaient avoir un métabolisme basal réduit en réponse à une température froide ou une contamination à long terme. Les mécanismes épigénétiques décrits chez ces individus pourraient avoir un lien avec l'auto-régulation. Une hyperméthylation de l'ADN induirait également une diminution de la transcription générale des gènes (Phillips, 2008). Un scénario de la réponse des individus au cours du temps est proposé en figure 7.3.

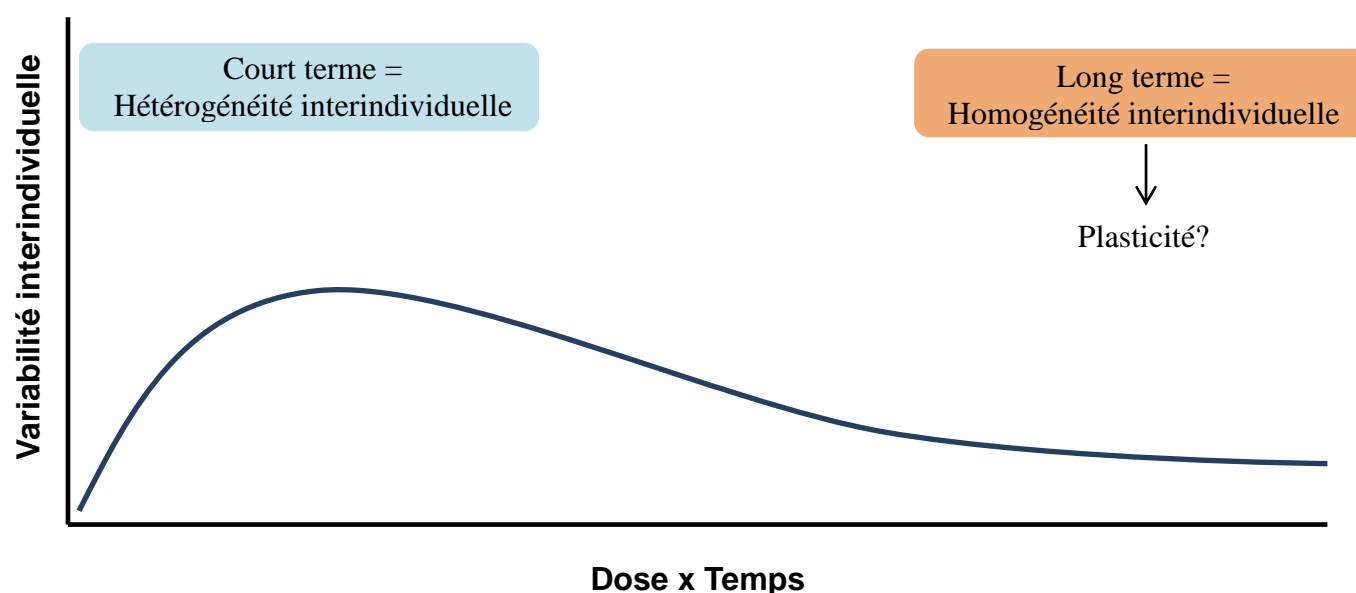


Figure 7.3 : Scénario hypothétique de la réponse des individus en fonction de la dose et du temps d'exposition

1.2. Approche anguille argentée

L'expérience de maturation artificielle d'anguilles argentées femelles et l'étude des gènes exprimés dans les gonades maturées ont permis de mettre en évidence le possible impact de la pollution sur les capacités reproductrices de l'espèce.

L'étude des gonades *via* la puce à ADN a permis de constater une diminution possible de la synthèse d'hormones stéroïdiennes, et plus particulièrement d'œstradiol, dans la mitochondrie. L'absence ou une faible synthèse d'hormones conduiraient alors, comme montré dans le chapitre 6, à une croissance limitée des gonades. En effet, l'indice gonadosomatique (GSI) était plus important chez les anguilles provenant du site propre que celles issues du site contaminé. Il est important de rappeler le caractère artificiel de la maturation des gonades par des injections hebdomadaires d'extraits hypophysaires de carpe. Cette stimulation intensive par un apport exogène d'hormones pourrait ne pas refléter les conditions réelles de maturation. Les effets observés demeurent alors difficilement extrapolables chez des anguilles argentées qui auraient mûri naturellement en mer. Néanmoins, l'absence de données toxicologiques sur des individus maturés naturellement ne permet pas à ce jour de confirmer ou infirmer ces résultats. Les connaissances passées et actuelles sur le stade argenté et l'impact possible de la contamination sur ce stade semblent néanmoins se recouper et converger vers une même hypothèse, mettant en cause la pollution des écosystèmes aquatiques sur la qualité des futurs géniteurs. Si ces derniers n'arrivaient pas à se reproduire cela pourrait conduire au déclin de cette espèce.

1.3. Conclusion

En conclusion, l'ensemble de ces études a montré l'intérêt probant de partir d'individus de terrain et de les comparer à des profils établis sur des individus exposés en laboratoire. En effet, outre le problème soulevé des limites des expositions expérimentales à reproduire la réalité du terrain (réalité des concentrations et du temps d'exposition), cette dynamique a permis d'identifier des mécanismes épigénétiques établis suite à une exposition à très long terme aux polluants. Cependant, malgré la plasticité exceptionnelle de l'anguille à s'adapter à son milieu, la pollution semble affecter sa capacité à assurer la pérennité de son espèce. La nageoire, outre sa pertinence à discriminer les différentes contaminations, permettrait i) une détection plus sensible des contaminations et ii) une hiérarchisation de leurs effets sur des individus prélevés sur le terrain. Le foie étant le siège de nombreuses voies métaboliques et également un bon accumulateur de contaminants, il apporterait une réponse plus globale chez

des individus multi-contaminés comme décrit en chapitre 3 où une forte contamination chronique amènerait à une baisse générale du métabolisme basal chez ces poissons. L'approche enfin sur les anguilles argentées a permis de réaliser une approche plus prédictive du devenir des populations des anguilles, puisqu'elles représentent les futurs géniteurs de la génération suivante. La possible incapacité de reproduction au travers des perturbations des polluants sur les organes sexuels représente un enjeu majeur dans la pérennité des populations d'anguilles.

2. Perspectives de recherche

Si nous avons pu répondre en partie aux questions posées à l'origine de ce travail, les résultats obtenus ont soulevé de nouvelles interrogations et offrent de nouvelles pistes de réflexion dans le domaine de l'écotoxicologie aquatique.

Dans le but de se rapprocher au mieux de la réalité du terrain, il serait en premier lieu nécessaire de diversifier les proies utilisées dans l'alimentation des individus. L'alimentation en milieu naturel est en effet variable et influence le métabolisme des organismes notamment par l'apport en lipides, sources importante d'énergie chez les anguilles pour leur croissance (Sanz et al., 1993). Il serait également pertinent d'utiliser des proies naturelles vivantes de l'anguille comme les crevettes. Ces dernières pourraient être prélevées sur Certes, le site de référence. Une fois au laboratoire il nécessiterait de les exposer aux polluants de façon séparée puis de les utiliser comme nourriture pour les anguilles. Cela permettrait de prendre également en compte les biotransformations des contaminants organiques possibles dans les organismes proies et qui par conséquent modifieraient la biodisponibilité du contaminant et son impact sur l'organisme prédateur.

Concernant le Cd, au vu de la part non négligeable de la voie trophique en milieu naturel pour ce métal, il conviendrait de réaliser une exposition conjointe du Cd par l'eau et l'alimentation (crevettes exposées au Cd au préalable en laboratoire). Ce dernier cas permettrait de mieux apprécier l'impact réel de ce contaminant en milieu naturel. Suite à cette nouvelle exposition, un nouveau profil transcriptomique devrait être établi au moyen de la puce à ADN sur le foie et la nageoire. La comparaison de ces nouveaux profils établis avec les profils transcriptomiques des individus de Gironde permettrait une meilleure estimation de la pression de contamination de ce métal en milieu naturel sur ces animaux.

Ces travaux de thèse ont également mis en évidence la sensibilité de la nageoire à répondre à une contamination et cela sans influence notable de la voie de contamination. Nous avons par ailleurs testé sa capacité de réponse, au premier abord, avec des contaminations relativement élevées en laboratoire et sur le terrain. Il serait par conséquent nécessaire de poursuivre les études sur cet organe en le testant sur des individus de terrain ayant une contamination très faible comme ceux provenant des sites Canadiens. Si cet organe permettait la distinction d'individus présentant de faibles contaminations, il représenterait alors un atout précieux dans les études écotoxicologiques dans les années futures pour la préservation des espèces.

Concernant l'aspect épigénétique soulevé au cours de ces travaux de thèse, la question aujourd'hui posée est de savoir à quelle échelle temporelle ces mécanismes se mettent en place ? En effet, nous avons établi des mécanismes épigénétiques tant en condition de laboratoire pour le Cd (et mis en évidence également dans Pierron et al., 2014) que chez des individus exposés pendant des années à un mélange de contaminants. D'autres questions également en découlent, celles de savoir i) si ces mécanismes sont l'œuvre d'un seul contaminant ou du mélange sur le long terme ii) si ces événements épigénétiques mesurés dans une contamination à court terme sont réversibles dans le temps. Un début de réponse pourrait être apporté en exposant au Cd des anguilles dans les mêmes conditions que dans la précédente étude et en les maintenant ensuite dans une eau « propre » pour une phase de décontamination afin de mesurer ensuite les niveaux de méthylation de l'ADN *via* le test Elisa développé dans Pierron et al., 2014, mais également le niveau de transcription des gènes *via* la puce à ADN.

La puce à ADN a été établie à partir des données de deux espèces d'anguilles, les études réalisées sur la nageoire et les gonades et la pertinence des réponses obtenues encourageraient à poursuivre les analyses sur d'autres espèces représentatives du milieu. En effet l'anguille, par son caractère panmictique ne permet pas d'établir un mécanisme possible d'adaptation d'une espèce sur plusieurs générations. La réalisation de profils d'expression issus de différentes espèces présentes dans l'estuaire de la Gironde permettrait de comparer les réponses de ces dernières avec celles de l'anguille et d'appréhender ainsi les différents mécanismes mis en place pour survivre dans un tel environnement. Ces différences d'adaptation permettraient peut être de mieux comprendre les raisons de l'effondrement de cette espèce qui jadis était pourtant considérée comme peu vulnérable à son environnement.

L'approche transcriptomique à haut débit est une approche relativement récente en écotoxicologie et la combinaison avec d'autres approches plus éprouvées seraient nécessaire pour valider certains résultats. La mesure des quantités protéiques et/ou des activités enzymatiques des protéines codées par les gènes différentiellement exprimés entre les conditions permettrait d'appuyer nos résultats. L'approche protéomique, dont le but est d'identifier et de quantifier les protéines présentes dans un échantillon, permettrait également de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans une contamination particulière.

Par exemple, dans les résultats du chapitre 4, la production de corps cétoniques pouvant être utilisés comme source d'énergie annexe chez les anguilles exposées au froid et aux contaminants avait été suggérée. Il serait alors intéressant de mesurer dans le foie de ces anguilles, le niveau d'activité de la 3-hydroxybutyrate déshydrogénase. Cette enzyme est une oxydoréductase qui métabolise l'acétoacétate en β -hydroxybutyrate (β OHB ; corps cétonique), substrat qui pourra ensuite être redirigé vers le plasma puis dans les organes capables d'utiliser cette source d'énergie (le cœur et le cerveau notamment), *via* le cycle de Krebs, en absence du glucose. Il nécessiterait également de mesurer en parallèle la concentration en corps cétoniques dans le foie par spectrophotométrie et spectromètre comme réalisé dans Segner et al., 1997. La mesure enfin des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la glycolyse et la gluconéogenèse et la mesure de leurs activités enzymatiques respectives serait pertinente. Une diminution notable de leur expression génétique et de leurs activités enzymatiques permettrait d'étayer la possible mise en place de la cétogenèse spéculée chez les anguilles dans nos résultats. Enfin, le β OHB est également un inhibiteur de l'histone déacétylase (HDAC) (pour revue Newman et Verdin, 2014) et modulerait l'expression des gènes via des modifications au niveau de la chromatine (Shimazu et al., 2013), ce qui permettrait une protection contre les maladies neurodégénératives chez le rat et l'humain, mais aussi une meilleure résistance contre les stressseurs cellulaires chez le vers nématode *C. elegans* (Shore et al., 2012). La mesure du niveau de transcription de l'HDAC permettrait également d'étayer l'hypothèse de l'implication de la cétogenèse et pourrait être reliée à la mise en place d'une protection générale de l'organisme contre le stress exercé par les contaminants. Enfin l'implication de l'HDAC dans ce mécanisme permettrait de faire un lien avec les mécanismes épigénétiques suggérés dans nos résultats.

In fine, l'objectif de la puce à ADN était de l'utiliser comme outil de diagnostic de la santé des anguilles. L'étude sur les anguilles argentées était une approche préliminaire en ce sens. En effet, ce stade représente les géniteurs des générations suivantes. L'impact négatif de la pollution sur la qualité des futurs reproducteurs au niveau transcriptomique montré dans cette thèse avance un premier argument sur la santé de la population. Cependant, l'approche avec les anguilles argentées demeure fastidieuse et soulève de nombreux biais discutés plus tôt. En outre, des approches complémentaires à la transcriptomique seraient nécessaires pour argumenter davantage la contribution de la pollution au déclin de l'espèce. Il serait pertinent alors de relier un profil transcriptomique à des données physiologiques sur l'anguille au stade jaune pour mieux établir un état de santé de l'individu. La combinaison de l'apport

transcriptomique et les données de croissance mais également le suivi de leur activité de nage ou la mesure du taux lipidique dans le muscle, élément primordial pour leur fournir de l'énergie pourraient être effectué conjointement aux mesures transcriptomiques. Cela permettrait de relier les niveaux de transcription de gènes à un effet au niveau physiologique. La combinaison de ces approches permettrait d'établir le profil d'un « bon » ou un « mauvais » état de santé des organismes.

Une fois de tels profils d'état de santé établis, il serait alors envisageable de réaliser un échantillonnage d'anguilles jaunes sur d'autres aires de vie des anguilles en Europe et en Amérique. En effet, le Saint-Laurent et la Gironde ont été choisis pour leur contexte historique de contamination mais ils ne représentent cependant pas l'ensemble des aires de répartition de ces deux espèces et la diversité des contaminants qu'elles peuvent rencontrer. Ainsi il serait pertinent de réaliser un échantillonnage sur un plus grand ensemble de leurs aires de vie et *via* la puce à ADN, investiguer leur état de santé à plus large échelle géographique.

Références

A

Aardemaa MJ, MacGregor JT (2002). Toxicology and genetic toxicology in the new era of “toxicogenomics”: impact of “-omics” technologies. *Mutat. Res.*, 499, 13–25

Aarestrup K, Økland F, Hansen MM, Righton D, Gargan P, Castonguay M, Bernatchez, Howey P, Sparholt H, Pedersen MI, McKinley RS (2009). Oceanic Spawning Migration of the European Eel (*Anguilla anguilla*). *Science*, 325 (5948), 1660.

Abdelouahab N, Vanier C, Baldwin M, Garceau S, Lucotte M, Mergler D (2008). Ecosystem matters: Fish consumption, mercury intake and exposure among fluvial lake fish-eaters *Sci. Total. Environ.*, 407(1), 154–164.

Al-Yousuf MH, El-Shahawi MS, Al-Ghais SM (2000). Trace metals in liver, skin and muscle of *Lethrinus lentjan* fish species in relation to body length and sex. *Sci. Total. Environ.*, 256 (2–3), 87–94.

Albert V, Jonsson B, Bernatchez L (2006). Natural hybrids in Atlantic eels (*Anguilla Anguilla*, *A. rostrata*): evidence for successful reproduction and fluctuating abundance in space and time. *Mol. Ecol.*, 15, 1903–1916

Alberto WD, Del Pilar DM, Valeria AM, Pesce SF, Hued AC, De Los Angeles BM (2001). Pattern recognition techniques for the evaluation of spatial and temporal variations in water quality. A case study: Suquia River Basin (Cordoba-Argentina). *Wat. Res.*, 35(12), 2881–2894.

Allan IJ, Mills GA, Vrana B, Knutsson J, Holmberg A, Guigues N, Laschi S, Fouillac A-M, Greenwood R (2006). Strategic monitoring for the European Water Framework Directive. *Trends Anal. Chem.*, 25(7).

Arai T, Kotake A, McCarthy TK (2006). Habitat use by the European eel *Anguilla anguilla* in Irish waters. *Estuar. Coast. Shelf S.*, 67, 569-578.

Avisé JC (2003) Catadromous eels of the North Atlantic: A review of molecular genetic findings relevant to natural history, population structure, speciation, and phylogeny *Dans Eel biology*. Springer-Verlag Tokyo., Tokyo. p. 31 à 48. 497 pages.

B

Baccarelli A, Bollati V (2009). Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr.*, 21(2), 243–251.

Bachour G, Failing K, Georgii S, Elmadfa I, Brunn H (1998). Species and Organ Dependence of PCB Contamination in Fish, Foxes, Roe Deer, and Humans. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 35, 666–673.

Baillon L, Pierron F, Coudret R, Normandeau E, Caron A, Peluhet L, Labadie P, Budzinski H, Durrieu G, Sarraco J, Elie P, Couture P, Baudrimont M, Bernatchez L (2015). Transcriptome profile analysis reveals specific signatures of pollutants in Atlantic eels. *Ecotoxicology*. 24(1), 71-84.

Baines SB, Fisher NS (2008). Modeling the effect of temperature on bioaccumulation of metals by a marine bioindicator organism, *Mytilus edulis*. *Environ. Sci. Technol.*, 42(9), 3277-3782.

Baudrimont M, de Montaudouin X, Palvadeau A (2006). Impact of digenean parasite infection on metallothionein synthesis by the cockle (*Cerastoderma edule*): multivariate field monitoring. *Mar. Pollut. Bull.*, 52, 494-502.

- Beaugrand G, Ibanez F, Lindley JA (2001). Geographical distribution and seasonal and diel changes in the diversity of calanoid copepods in the North Atlantic and North Sea. *Mar. Ecol-Prog. Ser.*, 219, 189-203.
- Belpaire CGJ, Goemans G, Geeraerts C, Quataert P, Parmentier K, Hagel P, De Boer J (2009). Decreasing eel stocks: survival of the fattest? *Ecol. Freshw. Fish*, 18, 197–214.
- Bernatchez L, St-Cyr J, Normandeau E, Maes GE, Als TD, Kalujnaia S, Cramb G, Castonguay M, Hansen MM (2011). Differential timing of gene expression regulation between leptocephali of the two *Anguilla* eel species in the Sargasso Sea. *Ecol. Evol.*, 1(4).
- Bertin L (1951). Les anguilles. Variation, croissance, euryhalinité, toxicité, hermaphrodisme juvénile et sexualité, migrations, métamorphoses. Paris Payot. 188 p
- Blanc N, Roussel F, Ornellas C (2012). Création de civelleries et d'unités d'élevage d'anguilles en France. Rapport du ministère de l'agriculture de l'agroalimentaire et de la forêt Rapport disponible sur <http://agriculture.gouv.fr>.
- Boetius J (1985) Greenland eels, *Anguilla rostrata* Lesueur. *Dana-J. Fish. Mar. Res.*, 4, 41-48.
- Boisclair D, Leggett WC (1989). Among-Population Variability of Fish Growth: I. Influence of the Quantity of Food Consumed. *Can. j. fish. aquat. sci.*, 46(3), 457-467.
- Bollati V, Baccarelli A (2010). Environmental epigenetics. *Heredity*, 105, 105–112.
- Bonhommeau S, Castonguay M, Rivot E, Sabatie R, Le Pape O (2010) The duration of migration of Atlantic *Anguilla* larvae. *Fish. Fish.*, 11(3), 289-306.
- Bonhommeau S, Le Pape O, Gascuel D, Blanke B, Treguier AM, Grima N, Vermard Y, Castonguay M, Rivot E (2009). Estimates of the mortality and the duration of the trans-Atlantic migration of European eel *Anguilla anguilla* leptocephali using a particle tracking model. *J. Fish Biol.*, 74(9), 1891-1914.
- Bordajandi LR, Gomez G, Fernandez MA, Abad E, Rivera J, Gonzalez MJ (2003). Study on PCBs, PCDD/Fs, organochlorine pesticides, heavy metals and arsenic content in freshwater fish species from the River Turia (Spain). *Chemosphere*, 53(2), 163-171.
- Borgert CJ, Quill TF, McCarty LS, Mason AM (2004). Can mode of action predict mixture toxicity for risk assessment? *Toxicol. Appl. Pharm.*, 201, 85– 96.
- Borja A, Franco J, Perez V (2000). A Marine Biotic Index to Establish the Ecological Quality of Soft-Bottom Benthos Within European Estuarine and Coastal Environments *Mar. Poll. Bull.*, 40(12), 1100-1114.
- Brauer MJ, Huttenhower C, Airoidi EM, Rosenstein R, Matese JC, Gresham D, Boer VM, Troyanskaya OG, Botstein D (2008). Coordination of Growth Rate, Cell Cycle, Stress Response, and Metabolic Activity in Yeast. *Mol. Biol. Cell*, 19, 352-367.
- Broughton RE, Milam JE, Roe BE (2001). The Complete Sequence of the Zebrafish (*Danio rerio*) Mitochondrial Genome and Evolutionary Patterns in Vertebrate Mitochondrial DNA *Genome Res.*, 11, 1958-1967.
- Buckman AH, Wong CS, Chow EA, Brown SB, Solomon KR, Fisk AT (2006). Biotransformation of polychlorinated biphenyls (PCBs) and bioformation of hydroxylated PCBs in fish. *Aquat. Toxicol.*, 78, 176–185.

- Calamari D, Marchetti R, Vailati G (1980). Influence of water hardness on cadmium toxicity to *salmo-gairdneri* rich. *Water Res.*, 14 (10), 1421-1426.
- Calabrese EJ, Baldwin LA (2003). The Hormetic Dose-Response Model Is More Common than the Threshold Model in Toxicology. *Toxicol. Sci.*, 71, 246–250.
- Calduch-Giner JA, Davey G, Saera-Vila A, Houeix B, Talbot A, Prunet P, Cairns MT, Pérez-Sánchez J (2010). Microarray technology to assess the time course of liver stress response after confinement exposure in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L). *BMC Genomics*, 11,193.
- Castonguay M, Hodson P, Moriarty C, Drinkwater KF, Jessop B (1994). Is there a role of ocean environment in American and European eel decline? *Fish. Oceanogr.* 3 (3), 197–203.
- Castonguay M, McCleave JD (1987) Vertical distributions, diel and ontogenic vertical migrations and net avoidance of leptocephali of *Anguilla* and other common species in the Sargasso Sea. *J. Plankton Res.*, 9(1),195-214.
- Causeur D (2011) Factor analysis for multiple testing (famt): an r package for large-scale significance testing under dependence. *J. Stat. Software.*, 40 (14).
- Chan HM, Trifonopoulos M, Ing A (1998). Consumption of freshwater fish in Khanawake: risks and benefits'. *Environ. Res.*, 80, 213–222.
- Clements WH, Rohr JR (2009). Community responses to contaminants: using basic ecological principles to predict ecotoxicological effects. *Environ. Toxicol. Chem.*, 28, 1789-1800.
- COSEPAC (2012) Évaluation et rapport de situation du COSEPAC sur l'Anguille d'Amérique (*Anguilla rostrata*) au Canada. Comité sur la situation des espèces en péril au Canada, Ottawa, Canada. xiii + 127 p. http://www.registrelep.gc.ca/Status/Status_f.cfm.
- Cossa D, Pham TT, Rondeau B, Quémerais B, Proulx S, Surette C (1998). Bilan massique des contaminants chimiques dans le fleuve Saint-Laurent, Rapport scientifique et technique ST-163, Centre Saint-Laurent, Environnement Canada – Région du Québec, Conservation de l'Environnement, Montréal, Québec, 258 pp.
- Coudret R. Stochastic modelling using large data sets: applications in ecology and genetics. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, Bordeaux, 2013.
- Couillard D (1982). Géologie et géochimie du fleuve, de l'estuaire et du Golfe Saint-Laurent (Canada). *Can. J. Earth Sci.*, 19, 1492-1506.
- Couillard CM, Hodson PV, Castonguay M (1997) Correlations between pathological changes and chemical contamination in American eels, *Anguilla rostrata*, from the St. Lawrence River. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54(8), 1916-1927.

- Dannewitz J, Maes GE, Leif Johansson L, Wickstrom H, Volckaert FAM, Järvi T (2005). Panmixia in the European eel: a matter of time. *Proc. R. Soc. B*, 272, 1129–1137.
- Dauer DM (1993) Biological criteria, environmental health and estuarine macrobenthic community structure. *Mar. Poll. Bull.*, 26 (5), 249-257.

- Daverat F, Limburg KE, Thibault I, Shiao J-C, Dodson JJ, Caron F, Tzeng W-N, Iizuka Y, Wickström H (2006). Phenotypic plasticity of habitat use by three temperate eel species, *Anguilla anguilla*, *A. japonica* and *A. rostrata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 308, 231–241.
- de Lafontaine Y, Gagne F, Blaise C, Costan G, Gagnon P, Chan HM (2000). Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquat. Toxicol.*, 50(1-2), 51-71.
- Deane EE, Woo NYS (2004). Differential gene expression associated with euryhalinity in sea bream (*Sparus sarba*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 287, 1054-1063.
- Dekker W (2003a). Eel Stocks dangerously close to collapse. ICES International Council for the Exploration of the Sea. <http://www.ices.dk/marineworld/eel.asp>
- Dekker W (2003b). Did lack of spawners cause the collapse of the European eel, *Anguilla anguilla*? *Fisheries Management and Ecology* 10: 365–376.
- Denslow ND, Garcia-Reyero N, Barber DS (2007). Fish “n” chips: the use of microarrays for aquatic toxicology. *Mol. bioSys.*, 3(3), 172–177.
- Depledge MH, Fossi, MC (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates in vertebrates. *Ecotoxicology*, 3(3), 161-172.
- Devin S, Giamberini L, Pain-Devin S (2014). Variation in variance means more than mean variations : What does variability tell us about population health status? *Environ. Int.*, 73, 282-287.
- Dolomatov S, Zukow W, Brudnicki R (2013). Role of Temperature in Regulation of the Life Cycle of Temperate Fish I Russian Journal of Marine Biology, 39 (2), 81–91.
- Downs SG, Macleod CL, Lester JN (1998). Mercury in precipitation and its relation to bioaccumulation in fish : A literature review. *Water Air Soil Poll.*, 108, 149–187.
- Dufour S (1994). Neuroendocrinologie de la reproduction de l'anguille : de la recherche fondamentale aux problèmes appliqués. *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, 335, 187-211.
- Dufour S, Le Belle N, Baloché S, Fontaine Y-A (1989). Positive feedback control by the gonads on gonadotropin (GTH) and gonadoliberein (GnRH) levels in experimentally matured female siver eels, *Anguilla anguilla*. *Fish Physiol. Biochem.*, 7, 157-162.
- Dufour S, Delerue-Le Belle N, Fontaine YA (1983). Effects of steroid hormones on pituitary immunoreactive gonadotropin in European freshwater eel, *Anguilla Anguilla* L. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 52(2), 190-197.
- Durif C (2003) La migration d'avalaison de l'anguille européenne *Anguilla anguilla*: caractérisation des fractions dévalantes phénomène de migration et franchissement d'obstacles. Thèse de doctorat (Université Paul Sabatier, Toulouse). 348 p
- Durrieu G, Maury-Brachet R, Girardin M, Rochard E, Boudou A (2005) Contamination by heavy metals (Cd, Zn, Cu and Hg) of eight fish species in the Gironde Estuary (France). *Estuaries*, 28(4), 581-591.

Ekblom R, Galindo J (2011). Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. *Heredity*, 107, 1-15.

Even S, Billen G, Bacq N, Théry S, Ruelland D, Garnier J, Cugier P, Michel Poulin M, Blanc S, Lamy F, Paffoni C (2007). New tools for modelling water quality of hydrosystems: An application in the Seine River basin in the frame of the Water Framework Directive. *Sci. Total Environ.*, 375, 274–291.

F

Falciani F, Diab AM, Sabine V, Williams TD, Ortega F, George SG, Chipman JK (2008). Hepatic transcriptomic profiles of European flounder (*Platichthys flesus*) from field sites and computational approaches to predict site from stress gene responses following exposure to model toxicants. *Aquat. Toxicol.*, 90, 92-101.

Feng S, Tillier ERM (2007). A fast and flexible approach to oligonucleotide probe design for genomes and gene families. *Bioinformatics*, 23(10), 1195-1202.

Feunteun E (2002). Management and restoration of European eel population (*Anguilla anguilla*): An impossible bargain. *Ecol. Eng.*, 18, 575–591.

Feunteun E, Acou A, Guillouët J, Laffaille P, Legault A (1998). Spatial distribution of an eel population (*Anguilla Anguilla* L.) in a small coastal catchment of northern Brittany (France). Consequences of hydraulic works. *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, 349, 129-139.

Friedland KD, Miller MJ, Knights B (2007). Oceanic changes in the Sargasso Sea and declines in recruitment of the European eel. *ICES J. Mar. Sci.*, 64 (3), 519-530.

Friguet C, Kloareg M, Causeur D (2009) A factor model approach to multiple testing under dependence. *J. Am. Stat. Assoc.*, 104(488), 1406-1415

G

Gagnaire PA, Albert V, Jónsson B, Bernatchez L (2009). Natural selection influences AFLP intraspecific genetic variability and introgression patterns in Atlantic eels. *Mol. Ecol.*, 18, 1678-1691.

Gagnon M (1998). Bilan régional - Rive sud de l'estuaire moyen du Saint-Laurent. Zones d'intervention prioritaire 15, 16 et 17. Environnement Canada - région du Québec, Conservation de l'environnement, Centre Saint-Laurent, 98 pages.

Geeraerts C, Belpaire C (2010) The effects of contaminants in European eel: a review. *Ecotoxicology*, 19(2), 239-266.

Gentry PR, McDonald TB, Sullivan DE, Shipp AM, Yager JW, Clewell HJ (2010). Analysis of genomic dose-response information on arsenic to inform key events in a mode of action for carcinogenicity. *Environ. Mol. Mutagen.*, 51, 1–14.

Gonzalez P, Baudrimont M, Boudou A, Bourdineaud JP (2006). Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *BioMetals*, 19, 225-235

Greenfield BK, Davis JA, Fairey R, Roberts C, Crane D, Ichikawa G (2005). Seasonal, interannual, and long-term variation in sport fish contamination, San Francisco Bay. *Sci.Total Environ.*, 336, 25–43.

Griffitt RJ, Greig TW, Chandler T, Quattro JM (2007). Serial analysis of gene expression reveals identifiable patterns in transcriptome profiles of *Palaemonetes pugio* exposed to three common environmental stressors. *Environ. Toxicol. Chem.*, 26 (11), 2413–2419.

Gül S, Belge-Kurutas E, Yıldız E, Sahan A, Doran F (2004). Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. *Environ. Int.*, 30, 605-609.

H

Haro A, Richkus W, Whalen K, Hoar A, Busch WD, Lary S, Brush T, Dixon D (2000). Population decline of the American eel: Implications for research and management. *Fisheries*, 25(9), 7-16.

Hazel JR (1995). Thermal adaptation in biological membranes: Is Homeoviscous Adaptation the Explanation? *Annu. Rev. Physiol.*, 57, 19-42.

Hodson PV, Castonguay M, Couillard C, Desjardins M, Pelletier E, McLeod R (1994). Spatial and Temporal Variations in Chemical Contamination of American Eels, *Anguilla rostrata*, Captured in the Estuary of the St. Lawrence River. *Can. j. fish. aquat. sci.*, 51(2): 464-478.

Hoff PT, Van Campenhout K, Van de Vijver K, Covaci A, Bervoets L, Moens L, Huyskens G, Goemans G, Belpaire C, Blust R, De Coen W (2005). Perfluorooctane sulfonic acid and organohalogen pollutants in liver of three freshwater fish species in Flanders (Belgium): relationships with biochemical and organismal effects. *Environ. Pollut.*, 137(2), 324-333.

Hook SE, Skillman AD, Small JA, Schultz IR (2006). Gene expression patterns in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, exposed to a suite of model toxicants. *Aquat. Toxicol.*, 77, 372–385.

Hudon C (1998). Metal accumulation in American wildcelery (*Vallisneria americana* Michx.) in the St. Lawrence River: effects of water depth and exposure to current', *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 55, 2317–2328.

I

ICES 2001. Report of the EIFAC/ICES Working Group on Eels. ICES CM 2001/ACFM:03. 87 pp.

ICES 2007. Report of the 2007 Session of the Joint EIFAC/ICES, Working Group on Eels, FAO European Inland Exploration of the Sea, Bordeaux, 3-7 September 2007. EIFAC Occasional Paper No. XX, ICES CM 2007/ACFM:23, Draft, 524pp. Available from <http://www.ices.dk/reports/ACOM/2007/WGEEL/WGEEL07draft.pdf>.

ICES 2009. Report of the 2009 Session of the Joint EIFAC/ICES Working Group on Eels (WGEEL), 7–12 September 2009, Göteborg, Sweden. ICES CM 2009, 137 pp.

Ion, J., de Lafontaine, Y., Dumont, P. and Lapierre, L.: 1997, 'Contaminant levels in The St. Lawrence River Yellow Perch (*Perca flavescens*) : spatial variation and implications for monitoring', *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54, 2930–2946.

IUCN 2014. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <http://www.iucnredlist.org>. Consulté le 24 Juillet 2014.

J

Jessop BM, Shiao J-C, Iizuka Y, Tzeng W-N (2002). Migratory behaviour and habitat use by American eels *Anguilla rostrata* as revealed by otolith microchemistry. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 233, 217–229.

K

Kircher M, Kelso J (2010). High-throughput DNA sequencing - concepts and limitations *BioEssays*, 32 (6), 524-536.

Kirk RS, Lewis JW, Kennedy CR (2000). Survival and transmission of *Anguillicola crassus* Kuwahara, Niimi & Itagaki, 1974 (Nematoda) in seawater eels. *Parasitology*, 120, 289-295.

Knights B (2003). A review of the possible impacts of longterm oceanic and climate changes and fishing mortality on recruitment of anguillid eels of the Northern Hemisphere. *Sci. Total Environ.*, 310, 237–244.

Kwan KHM, Chan HM, de Lafontaine Y (2003). Metal contamination in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) along the St. Lawrence River. *Environ. Monit. Assess.*, 88(1-3), 193-219.

L

Labadie P, Alliot F, Bourges C, Desportes A, Chevreuil M (2010). Determination of polybrominated diphenyl ethers in fish tissues by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry: case study on European eel (*Anguilla anguilla*) from Mediterranean coastal lagoons. *Anal. Chim. Acta.*, 675(2), 97–105.

Lebeuf L, Nunes T (2005). PCBs and OCPs in Sediment Cores from the Lower St. Lawrence Estuary, Canada: Evidence of Fluvial Inputs and Time Lag in Delivery to Coring Sites *Environ. Sci. Technol.*, 2005, 39, 1470-1478.

Lee HK, Hsu AK, Sajdak J, Qin J, Pavlidis P (2004). Coexpression Analysis of Human Genes Across Many Microarray Data Sets. *Genome Res.*, 14, 1085-1094.

Letcher RJ, Norstrom RJ, Muir DCG (1998). Biotransformation versus Bioaccumulation: Sources of Methyl Sulfone PCB and 4,4'-DDE Metabolites in the Polar Bear Food Chain. *Environ. Sci. Technol.*, 32, 1656-1661.

Lettieri T (2006). Recent Applications of DNA Microarray Technology to Toxicology and Ecotoxicology. *Environ. Health. Perspect.*, 114, 4–9.

Luhmann N (2004). Einführung in die Systemtheorie. 2nd ed, Carl-Auer-Systeme, Heidelberg
Steinberg CEW, Ade M (2005). Ecotoxicology, where do you come from and where do you go? *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 12 (5), 245 – 246.

M

Maes J, Belpaire C, Goemans G (2008). Spatial variations and temporal trends between 1994 and 2005 in polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and heavy metals in European eel (*Anguilla anguilla* L.) in Flanders, Belgium. *Environmental Pollution* 153: 223–237.

Matsuda M, Kawato N, Asakawa S, Shimizu N, Nagahama Y, Hamaguchi S, Sakaizumi M, Hori H (2001). Construction of a BAC library derived from the inbred Hd-rR strain of the teleost fish, *Oryzias latipes*. *Genes Genet. Syst.*, 76, 61-63.

McCarty LS, Mackay D (1993). Enhancing ecotoxicological modeling and assessment. *Body Residues and Modes Of Toxic Action. Environ. Toxicol. Chem.*, 27, 1719-1727.

McCleave JD, Kleckner RC (1987). Distribution of leptocephali of the catadromous *Anguilla* species in the Western Sargasso Sea in relation to water circulation and migration. *Bull. Mar. Sci.*, 41(3), 789-806.

McHugh B, Poole R, Corcoran J, Anninou P, Boyle B, Joyce E, Foley BM, McGovern E. 2010. The occurrence of persistent chlorinated and brominated organic contaminants in the European eel (*Anguilla anguilla*) in Irish Waters. *Chemosphere*, 79, 305–313.

Merrick BA, Bruno ME (2004). Genomic and Proteomic Profiling for Biomarkers and Signature Profiles of Toxicity. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 6, 600–607.

Metcalf JL, Charlton MN (1990). Freshwater mussels as biomonitors for organic industrial contaminants and pesticides in the St. Lawrence River. *Sci. Total Environ.*, 97(98), 595–615.

Metcalf-Smith JL, Merriman JC, Batchelor SP (1992). Relationships between concentrations of metals in sediment and two species of freshwater mussels in the Ottawa River. *Water Poll. Res. J. Canada*, 27, 845–869.

Miracle AL, Ankley GT (2005). Ecotoxicogenomics: linkages between exposure and effects in assessing risks of aquatic contaminants to fish. *Reprod. Toxicol.*, 19, 321–326.

Moore MN, Depledge MH, Readman JW, Paul Leonard DR (2004). An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat. Res.* 552, 247-68.

N

Nendza M, Herbs T, Kussatz C, Gies A (1997). Potential for secondary poisoning and biomagnification in marine organisms. *Chemosphere*, 35(9), 1875-1885.

Neumann NF, Galvez F (2002). DNA microarrays and toxicogenomics: applications for ecotoxicology? *Biotechnol. Adv.*, 20, 391–419.

Nevozhay D, Adams RM, Murphy KF, Josić K, Balázs G (2009). Negative autoregulation linearizes the dose–response and suppresses the heterogeneity of gene expression. *PNAS*, 106(13), 5123-5128.

Newman JC, Verdin E (2014). Ketone bodies as signaling metabolites. *Cell*, 25(1), 42-52.

Nuwaysir EF, Bittner M, Trent J, Barrett C, Afshari CA (1999). Microarrays and Toxicology: The Advent of Toxicogenomics. *Mol Carcinogen*, 24, 153–159.

O

Owen J, Hedley BY, Svendsen C, Wren J, Jonker MJ, Hankard PK, Lister LJ, Stürzenbaum SR, AJ, Spurgeon DJ, Blaxter ML, Kille P (2008). Transcriptome profiling of developmental and xenobiotic responses in a keystone soil animal, the oligochaete annelid *Lumbricus rubellus*. *BMC Genomics*, 9, 266.

- Palstra AP, Heppener DFM, van Ginneken VJT, Szekely C, van den Thillart G (2007). Swimming performance of silver eels is severely impaired by the swim-bladder parasite *Anguillicola crassus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 352(1), 244-256.
- Palstra AP, van Ginneken VJT, Murk AJ, van der Thillart GEEJM (2006). Are dioxin-like contaminants responsible for the eel (*Anguilla anguilla*) drama? *Naturwissenschaften*, 93(3):145-148.
- Paquin PR, Santore RC, Wu KB, Kavvas CD, Di Toro DM (2000). The biotic ligand model: a model of the acute toxicity of metals to aquatic life. *Environ. Sci. Policy*, 3 (1), 175–182
- Pearce AK, Humphrey TC (2001). Integrating stress-response and cell-cycle checkpoint pathways. *Trends Cell Biol.*, 11, 426-433.
- Pedersen BH (2003). Induced sexual maturation of the European eel *Anguilla anguilla* and fertilisation of the eggs. *Aquaculture*, 224, 323-338.
- Pedersen BH (2004). Fertilisation of eggs, rate of embryonic development and hatching following induced maturation of the European eel *Anguilla Anguilla*. *Aquaculture*, 237, 461–473.
- Pham TT, Proulx S, Brochu C, Moore S (1999). Composition of PCBs and PAHs in the Montreal Urban Community Wastewater Treatment Plant and in the Surface Water of the St. Lawrence River (Canada). *Water Air Soil Poll.*, 111, 251–270.
- Phillips, T (2008). The role of methylation in gene expression. *Nature Education*, 1(1),116.
- Pierron F, Normandeau E, Defo MA, Campbell PGC, Bernatchez L, Couture P (2011). Effects of chronic metal exposure on wild fish populations revealed by high-throughput cDNA sequencing. *Ecotoxicology.*, 20(6), 1388-99.
- Pierron F, Baudrimont M, Dufour S, Elie P, Bossy A, Lucia M, Massabuau J-C (2009). Ovarian gene expression and effect of cadmium pre-exposure during artificial sexual maturation of the European eel (*Anguilla anguilla*). *Biometals*, 22(6), 985-994.
- Pierron F, Baillon L, Sow M, Gotreau S, Gonzalez P (2014). Effect of Low-Dose Cadmium Exposure on DNA Methylation in the Endangered European Eel. *Environ. Sci. Technol.*, 48, 797-803.
- Pierron F (2007a) Études des mécanismes de bioaccumulation du cadmium et des effets toxiques associés à différents stades de vie de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla* L.). Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, Bordeaux, France. 294 pages
- Pierron F, Baudrimont M, Bossy A, Bourdineaud JP, Brethes D, Elie P, Massabuau JC (2007b). Impairment of lipid storage by cadmium in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquat.Toxicol.*, 81(3), 304-311.
- Pierron F, Baudrimont M, Gonzalez P, Bourdineaud JP, Elie P, Massabuau JC (2007c). Common pattern of gene expression in response to hypoxia or cadmium in the gills of the European glass eel (*Anguilla anguilla*). *Environ. Sci. Technol.*, 41(8), 3005-3011.
- Porte C, Albaigés J (1993). Bioaccumulation Patterns of Hydrocarbons and Polychlorinated Biphenyls in Bivalves, Crustaceans, and Fishes Arch. Environ. Contam. Toxicol., 26, 273-281.

Poynton HC, Loguinov AV, Varshavsky JR, Chan S, Perkins EJ, Vulpe CD (2008a). Gene Expression Profiling in *Daphnia magna* Part I: Concentration-Dependent Profiles Provide Support for the No Observed Transcriptional Effect Level. *Environ. Sci. Technol.*, 42, 6250–6256.

Poynton HC, Varshavsky JR, Chang B, Cavigliolo G, Chan S, Holman PS, Loguinov AV, Bauer DJ, Komachi K, Theil JE, Perkins EJ, Hughes O, Vulpe CD (2007). *Daphnia magna* ecotoxicogenomics provides mechanistic insights into metal toxicity. *Environ. Sci. Technol.*, 41, 1044-1050.

Poynton HC, Zuzow R, Loguinov AV, Perkins J, Vulpe C.D (2008b). Gene Expression Profiling in *Daphnia magna*, Part II: Validation of a Copper Specific Gene Expression Signature with Effluent from Two Copper Mines in California. *Environ. Sci. Technol.*, 42, 6257–6263.

Pujolar JM, Jacobsen MW, Als TD, Frydenberg J, Munch K, Jonsson B, Jian JB, Cheng L, Maes GE, Bernatchez L, Hansen MM (2014). Genome-wide single-generation signatures of local selection in the panmictic European eel. *Mol. Ecol.*, 23, 2514-2528.

Pujolar JM, Marino IAM, Massimo M, Coppe A, Maes GE, Capoccioni F, Ciccotti E, Bervoets L, Covaci A, Belpaire C, Cramb G, Patarnello T, Bargelloni L, Bortoluzzi S, Zane L (2012) Surviving in a toxic world: transcriptomics and gene expression profiling in response to environmental pollution in the critically endangered European eel. *BMC Genomics*, 13, 507.

Q

Qian W, Ba Y, Zhuang Q, Zhong G (2014). RNA-Seq Technology and Its Application in Fish Transcriptomics. *OMICS*, 18(2), 98-110.

R

Rasmussen JB, Gunn JM, Sherwood GD, Iles A, Gagnon A, Campbell PGC, Hontela A (2008). Direct and indirect (foodweb mediated) effects of metal exposure on the growth of yellow perch (*Perca flavescens*): implications for ecological risk assessment. *Human Ecol. Risk Assess.*, 14, 317-350.

Renault S, Daverat F, Pierron F, Gonzalez P, Dufour S, Lanceleur L, Schäfer J, Baudrimont M (2011). The use of Eugenol and electro-narcosis as anaesthetics: Transcriptional impacts on the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotox. Environ. Safety*, 74, 1573–1577.

Roche H, Buet A, Ramade F (2002). Relationships between persistent organic chemical residues and biochemical constituents in fish from a protected area: the French National Nature Reserve of Camargue. *Comp. Biochem. Physiol. C, Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 133(3), 393-410.

Rosenfeld N, Elowitz MB, Alon U (2002). Negative autoregulation speeds the response times of transcription networks. *J. Mol. Biol.*, 323, 785–793.

S

Sadler LK (1979). Effects of temperature on the growth and survival of the European eel, *Anguilla Anguilla*. *J. Fish Biol.*, 15 (4), 499-507.

Sanz A, Suarez MD, Hidalgo MC, Gallego MG, De la Higuera M (1993). Feeding of the European eel *Anguilla anguilla*. III. Influence of the relative proportions of the energy yielding nutrients. *Camp. Biochem. Physiol.*, 105A(1), 177-182.

Schäfer J, Blanc G, Lapaquellerie Y, Maillet N, Maneux E, Etcheber H (2002). Ten year observation of the Gironde tributary fluvial system: fluxes of suspended matter, particulate organic carbon and cadmium. *Mar. Chem.*, 79, 229-242.

Schirmer K, Fischer BB, Madureira DJ, Smitha Pillai S (2010). Transcriptomics in ecotoxicology. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397, 917-923.

Schmidt J (1922). The breeding places of the eel. *R. Soc. Lond. B.*, 211, 179-211.

Schmitz M, Aroua S, Vidal B, Le Belle N, Elie P, Dufour S (2005). Differential regulation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone expression during ovarian development and under sexual steroid feedback in the European eel. *Neuroendocrinology*, 81(2), 107-119.

Scott WB, Crossman EJ (1974). *Les poissons d'eau douce du Canada*. Office des recherches sur les pêcheries du Canada. Bulletin N°184, 966 pages.

Sébert P (2003). Fish adaptations to pressure. Dans : Val, A.L. and Kapoor, B.G., Eds., *Fish Adaptations*, Science Publisher, Enfield., pp. 73–95.

Segner H, (2007). Ecotoxicology, how to assess the impact of toxicants in a multi-factorial environment? Multiple Stressors: A Challenge for the Future. *NATO Sci. Peace Secur.*, 39-56.

Shimazu T, Hirschey MD, Newman J, He W, Shirakawa K, Le Moan N, Grueter CA, Lim H, Saunders LR, Stevens RD, Newgard CB, Farese RV Jr, de Cabo R, Ulrich S, Akassoglou K, Verdin E (2013). Suppression of Oxidative Stress by b-Hydroxybutyrate, an Endogenous Histone Deacetylase Inhibitor. *Science*, 339, 211-214.

Shore DE, Carr CE, Ruvkun G (2012). Induction of Cytoprotective Pathways Is Central to the Extension of Lifespan Conferred by Multiple Longevity Pathways. *PLoS Genet.*, 8(7), e1002792.

Simon R, Lam A, Li MC, Ngan M, Menenzes S, Zhao Y (2007). Analysis of Gene Expression Data Using BRB-Array Tools. *Cancer Inform.*, 3, 11–17.

Snape JR, Maun SJ, Pickford DB, Hutchinson TH (2004). Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquat. Toxicol.*, 67, 143–154.

Steinberg CEW, Ade M (2005). Ecotoxicology, where do you come from and where do you go? *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 12(5) 245-246.

Stekel DJ, Jenkins DJ (2008). Strong negative self regulation of prokaryotic transcription factors increases the intrinsic noise of protein expression. *BMC Syst. Biol.*, 2(6), 1-14.

Stone R (2003) Ecology - Freshwater eels are slip-sliding away. *Science*, 302 (5643), 221-222.

T

Tapie N (2006). Contamination des écosystèmes aquatiques par les PCB et PBDE : application à l'estuaire de la Gironde. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux, Bordeaux, France.

Tapie N, Le Menach K, Pasquaud S, Elie P, Devier MH, Budzinski H (2011). PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary : From glass eels to silver eels. *Chemosphere*, 83, 175-85.

Tesch FW (2003) *The Eel*. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, 3e édition (édition anglaise). 408 pages.

Tomie JPN, Cairns DK, Courtenay SC (2013). How American eels *Anguilla rostrata* construct and respire in burrows. *Aquat Biol*, 19, 287–296.

Trenzado CE, Carrick TR, Pottinger TG (2003). Divergence of endocrine and metabolic responses to stress in two rainbow trout lines selected for differing cortisol responsiveness to stress. *Gen.Comp. Endocr.*, 133, 332–340.

U

U.S.EPA (United States Environmental Protection Agency), (2000) (August). Supplementary Guidance for Conducting Health Risk Assessment of Chemical Mixtures U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

V

Van Aggelen G, Ankley GT, Baldwin WS, Bearden DW, Benson WH, Chipman JK, Collette TW, John A. Craft JA, Denslow ND, Embry MR, Falciani F, George SG, Helbing CC, Hoekstra PF, Iguchi T, Kagami Y, Katsiadaki I, Kille P, Liu L, Lord PG, McIntyre T, O'Neill A, Osachoff H, Perkins EJ, Santos EM, Skirrow RC, Snape JR, Tyler CR, Versteeg D, Viant MR, Volz DC, Williams TD, Yu L (2010). Integrating Omic Technologies into Aquatic Ecological Risk Assessment and Environmental Monitoring: Hurdles, Achievements, and Future Outlook. *Environ. Health Perspect.*, 118 (1), 1-5.

van Dyk JC, Pieterse GM, van Vuren JHJ (2007). Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 66, 432–440.

van Ginneken VJT, Maes GE (2005). The European eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus), its lifecycle, evolution and reproduction: a literature review. *Rev. Fish. Biol. Fish.*, 15(4), 367-398.

Van Straalen NM (2003). Ecotoxicology becomes stress ecology. *Environ. Sci. Technol.*, 37, 325–330.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW (1995). Serial analysis of gene expression. *Science*, 270, 484–487.

Veldhoen N, Stevenson MR, Skirrow RC, Rieberger KJ, van Aggelen G, Meays CL, Helbing CC (2013). Minimally invasive transcriptome profiling in salmon: Detection of biological response in rainbow trout caudal fin following exposure to environmental chemical contaminants. *Aquat. Toxicol.*, 142 (143), 239-247.

Vidal B, Pasqualini C, Le Belle N, Holland MCH, Sbaili M, Vernier P, Zohar Y, Dufour S (2004) Dopamine inhibits luteinizing hormone synthesis and release in the juvenile European eel: A neuroendocrine lock for the onset of puberty. *Biol. Reprod.*, 71(5), 1491-1500.

Vighi M, Finizio A, Villa S (2006). The Evolution of the Environmental Quality Concept: From the US EPA Red Book to the European Water Framework Directive. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 13 (1), 9 – 14.

Vighi M, Villa S (2013). Ecotoxicology: The Challenges for the 21st Century. *Toxics*, 1, 18-35.

Vijayan MM, Pereira C, Grau EG, Iwama GK (1997). Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comp. Biochem. Physiol.*, 116C, 89-95.

W

Wang CH, Tzeng WN (2000). The timing of metamorphosis and growth rates of American and European eel *leptocephali*: A mechanism of larval segregative migration. *Fish Res.*, 46(1-3), 191-205.

Watanabe H, Tatarazako N, Oda S, Nishide H, Uchiyama I, Morita M, Iguchi T (2005). Analysis of expressed sequence tags of the water flea *Daphnia magna*. *Genome*, 48, 606-609.

Waters MD, Merrick AB (2009). Toxicogenomics and the Evolution of Systems Toxicology. General, Applied and Systems Toxicology.

Waters MD, Fostel JM (2004). Toxicogenomics and systems toxicology: aims and prospects. *Nature*, 5, 936-948.

Waters MD, Selrik JK, Olden K (2003). The impact of new technologies on human population studies. *Mutation Research*, 544, 349-360.

Wenger R (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J.*, 16, 1151-1162.

Westin L (2003). Migration failure in stocked eels *Anguilla anguilla*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 254, 307–311.

Wirth T, Bernatchez L (2003). Decline of North Atlantic eels: a fatal synergy? *Proc. R. Soc. B. Biol. Sci.*, 270(1516), 681-688.

Wolffe AP, Guschin D (2000). Review: chromatin structural features and targets that regulate transcription. *J. Struct. Biol.*, 129, 102–122.

Z

Zhou Q, Zhang J, Fu J, Shi J, Jiang G (2008). Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal. Chem. Acta.*, 606, 135-150.

Annexes

Annexe 1 : List of the 190 differentially transcribed genes in laboratory experiment and wild eels. Results are presented as mean fold change where wild fish were compared to experimental eels. Analyses were carried out by means of the class comparison tool available in the BRB array tools software ($P < 0.01$).

Probe name	Gene name	gene abbreviation	ANOVA		Fold-change
			<i>pvalue</i>	FDR	
contig_11347	Zinc finger protein 710	znf710	< 1e-07	< 1e-07	2,17
contig_21467	Pleckstrin homology domain-containing family A member 7	plekha7	< 1e-07	< 1e-07	2,42
contig_19602	Vacuolar protein sorting-associated protein 11 homolog	vps11	< 1e-07	< 1e-07	1,58
contig_26223	Mothers against decapentaplegic homolog 6	smad6	< 1e-07	< 1e-07	1,67
contig_20736	InaD-like protein	iNAdl	< 1e-07	< 1e-07	1,58
contig_28807	Period circadian protein homolog 1	per1	< 1e-07	< 1e-07	1,57
contig_14213	Collagen alpha-2(VI) chain	col6a2	< 1e-07	< 1e-07	2,03
contig_16709	Golgi resident protein GCP60	acbd3	< 1e-07	< 1e-07	0,61
contig_20884	Trypsin-1	prss1	< 1e-07	< 1e-07	2,16
contig_18055	Histone RNA hairpin-binding protein	slbp	< 1e-07	< 1e-07	0,52
contig_35278	Serum response factor-binding protein 1	srfbp1	< 1e-07	< 1e-07	1,85
contig_6092	L-serine dehydratase/L-threonine deaminase	sds	< 1e-07	< 1e-07	1,98
contig_6067	Protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha	fnta	< 1e-07	< 1e-07	1,67
contig_38960	Endophilin-A3	sh3gl3	< 1e-07	< 1e-07	2,06
contig_8430	RNA-binding protein 45	rbm45	< 1e-07	< 1e-07	1,97
contig_18213	Leukemia inhibitory factor receptor	lifr	< 1e-07	< 1e-07	0,71
contig_29875	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	prkdc	< 1e-07	< 1e-07	1,71
contig_21930	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase CYLD	cyld	< 1e-07	< 1e-07	0,73
contig_10692	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit gamma	camk2g	< 1e-07	< 1e-07	0,58
contig_12678	Hemoglobin cathodic subunit beta	hbb2	< 1e-07	< 1e-07	0,72
contig_1269	Pre-mRNA branch site protein p14	sf3b14	< 1e-07	< 1e-07	1,81
contig_16779	snRNA-activating protein complex subunit 4	sNApc4	< 1e-07	< 1e-07	1,37

Suite

contig_1847	Probable arginine--tRNA ligase, mitochondrial	rars2	< 1e-07	< 1e-07	0,68
contig_30841	Protein atonal homolog 8	atoh8	< 1e-07	< 1e-07	0,69
contig_26781	RNA-binding protein 39	rbm39	< 1e-07	< 1e-07	1,8
contig_9997	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13	adamts13	< 1e-07	< 1e-07	0,77
contig_11191	Sorting nexin-27	snx27	< 1e-07	1,22E-06	0,76
contig_33173	Zinc transporter ZIP6	slc39a6	< 1e-07	1,22E-06	1,57
contig_26596	Sortilin-related receptor	sorl1	< 1e-07	1,22E-06	1,61
contig_15834	Zinc finger CCCH domain-containing protein 18	zc3h18	1,00E-07	1,22E-06	1,65
contig_22796	Polyadenylate-binding protein 1	pabpc1	1,00E-07	1,22E-06	0,74
contig_155	Protein canopy homolog 2	cnpy2	1,00E-07	1,22E-06	1,45
contig_14369	GTP cyclohydrolase 1	gch1	1,00E-07	1,22E-06	0,64
contig_19263	Protein RTF2 homolog	rtfdc1	2,00E-07	2,17E-06	0,67
contig_37808	Oxysterol-binding protein-related protein 1	osbpl1a	2,00E-07	2,17E-06	0,68
contig_16092	39S ribosomal protein L37, mitochondrial	mrpl37	2,00E-07	2,17E-06	1,74
contig_36254	Twinfilin-1	twf1	2,00E-07	2,17E-06	0,63
contig_29319	Trypsin-1	prss1	3,00E-07	3,01E-06	1,41
contig_18070	Kinectin	ktn1	3,00E-07	3,01E-06	0,72
contig_4515	COP9 signalosome complex subunit 3	cops3	3,00E-07	3,01E-06	1,6
contig_11440	D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase, mitochondrial	d2hgdh	4,00E-07	3,91E-06	0,72
contig_15422	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 2	ergic2	7,00E-07	6,38E-06	1,57
contig_39448	14-3-3 protein beta/alpha-A	ywhaba	7,00E-07	6,38E-06	1,52
contig_27318	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 45	usp45	7,00E-07	6,38E-06	1,65
contig_15305	Protein SDE2 homolog	sde2	8,00E-07	6,97E-06	0,72
contig_1859	Cytohesin-2	cyth2	8,00E-07	6,97E-06	0,71
contig_3075	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim13	timm13	9,00E-07	7,52E-06	0,7
contig_25366	TBC1 domain family member 9	tbc1d9	9,00E-07	7,52E-06	2,18
contig_8110	Alkaline ceramidase 3	acer3	1,00E-06	8,18E-06	1,4
contig_19526	Protein-tyrosine sulfotransferase 1	tpst1	1,20E-06	9,62E-06	1,39

Suite

contig_15072	BCL-6 corepressor	bcor	1,40E-06	1,08E-05	0,76
contig_14933	Regulator of G-protein signaling 7	rgs7	1,40E-06	1,08E-05	1,46
contig_39060	Serine/threonine-protein kinase 17A	stk17a	1,90E-06	1,44E-05	0,75
contig_11861	Retinol-binding protein 2	rbp2	2,10E-06	1,56E-05	0,76
contig_24288	Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	dhx15	2,90E-06	2,11E-05	1,56
contig_33219	High mobility group protein B2	hmgb2	3,10E-06	2,22E-05	0,71
contig_6543	NEDD4-like E3 ubiquitin-protein ligase WWP1	wwp1	3,60E-06	2,53E-05	0,73
contig_24638	T-complex protein 1 subunit delta	cct4	4,10E-06	2,83E-05	0,68
contig_29369	Nitrilase homolog 1	nit1	4,20E-06	2,85E-05	1,47
contig_26848	52 kDa repressor of the inhibitor of the protein kinase	prkrir	4,90E-06	3,27E-05	1,36
contig_18895	3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7	hsd3b7	6,10E-06	4,01E-05	1,44
contig_33460	Ribonuclease inhibitor	rnh1	6,20E-06	4,01E-05	1,54
contig_14737	Luc7-like protein 3	luc7l3	7,10E-06	4,52E-05	1,46
contig_13946	Enhancer of polycomb homolog 1	epc1	9,10E-06	5,70E-05	0,61
contig_35542	Arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein	rere	9,90E-06	6,08E-05	1,38
contig_34936	Vascular endothelial growth factor A-A	vegfaa	1,00E-05	6,08E-05	0,82
contig_25419	60S ribosomal protein L4	rpl4	1,03E-05	6,16E-05	0,67
contig_36880	Transcription factor E2-alpha	tcf3	1,06E-05	6,25E-05	1,28
contig_1304	Ethanolamine-phosphate cytidyltransferase	pcyt2	1,31E-05	7,61E-05	1,48
contig_17696	Upstream stimulatory factor 1	usf1	1,33E-05	7,62E-05	0,75
contig_14467	Cyclin-I	ccni	1,58E-05	8,92E-05	0,61
contig_21805	Coiled-coil domain-containing protein 43	ccdc43	1,63E-05	9,08E-05	0,73
contig_22182	Transmembrane protein 106C	tmem106c	1,67E-05	9,17E-05	0,72
contig_20155	GTP-binding protein SAR1b	sar1b	1,80E-05	9,75E-05	0,76
contig_19635	GTP-binding protein 1	gtpbp1	1,94E-05	1,04E-04	1,43
contig_35399	Afadin	mllt4	1,97E-05	1,04E-04	1,35
contig_15765	Acylamino-acid-releasing enzyme	apeh	2,27E-05	1,18E-04	1,39

Suite

contig_19308	Ras-related protein R-Ras2	rras2	2,39E-05	1,23E-04	1,51
contig_2284	Protein arginine N-methyltransferase 7	prmt7	3,32E-05	1,69E-04	1,33
contig_18558	Protein furry homolog	fry	3,74E-05	1,87E-04	0,81
contig_14823	Protein phosphatase PTC7 homolog	pptc7	4,15E-05	2,03E-04	1,46
contig_14959	Solute carrier family 22 member 23	slc22a23	4,16E-05	2,03E-04	1,38
contig_31300	Retinoic acid receptor RXR-beta-A	rxrba	4,20E-05	2,03E-04	1,93
contig_2761	ATP-binding cassette sub-family A member 1	abca1	5,51E-05	2,60E-04	1,39
contig_35595	SH2 domain-containing protein 5	sh2d5	5,52E-05	2,60E-04	0,8
contig_13836	Tubulin alpha chain	NA	6,29E-05	2,93E-04	1,53
contig_39706	Protein sel-1 homolog 1	sel1l	6,35E-05	2,93E-04	0,81
contig_4232	Decorin	dcn	6,65E-05	3,03E-04	1,36
contig_2245	Calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1A	pde1a	7,58E-05	3,42E-04	0,78
contig_26357	Integral membrane protein 2A	itm2a	8,42E-05	3,75E-04	1,45
contig_4248	Deoxyribonuclease gamma	dNAse113	9,79E-05	4,27E-04	0,75
contig_40579	Lysine-specific demethylase 4A	kdm4a	9,84E-05	4,27E-04	1,45
contig_19495	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	psmd12	9,96E-05	4,27E-04	0,62
contig_5818	1,25-dihydroxyvitamin D(3) 24-hydroxylase, mitochondrial	cyp24a1	1,00E-04	4,27E-04	0,74
contig_20250	Myelin expression factor 2	myef2	1,07E-04	4,51E-04	0,78
contig_40186	5-aminolevulinate synthase, erythroid-specific, mitochondrial	alas2	1,12E-04	4,69E-04	0,8
contig_18402	Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal	eif1ax	1,22E-04	5,04E-04	0,77
contig_12003	WD repeat-containing protein 37	wdr37	1,23E-04	5,04E-04	1,46
contig_20014	Hepatocyte nuclear factor 4-beta	hnf4b	1,42E-04	5,74E-04	1,28
contig_14264	Rho guanine nucleotide exchange factor 16	arhgef16	1,47E-04	5,85E-04	1,45
contig_33287	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J-A	eif3ja	1,47E-04	5,85E-04	1,22
contig_36261	Beta,beta-carotene 9',10'-oxygenase	bco2	1,76E-04	6,92E-04	0,71
contig_14185	Desmoglein-2	dsg2	1,79E-04	6,95E-04	1,5
contig_24654	TATA-binding protein-associated factor 2N	taf15	1,94E-04	7,48E-04	1,31

Suite

contig_11607	REST corepressor 3	rcor3	1,96E-04	7,48E-04	0,79
contig_4579	39S ribosomal protein L3, mitochondrial	mrpl3	1,98E-04	7,50E-04	1,45
contig_4477	Protein dispatched homolog 1	disp1	2,01E-04	7,52E-04	0,75
contig_20337	Tetratricopeptide repeat protein 4	ttc4	2,10E-04	7,73E-04	0,83
contig_36005	Cyclin-T2	ccnt2	2,10E-04	7,73E-04	0,84
contig_38699	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2	slc38a2	2,30E-04	8,37E-04	0,72
contig_2379	Solute carrier family 22 member 4	slc22a4	2,36E-04	8,45E-04	1,23
contig_21237	Interleukin-11 receptor subunit alpha	il11ra	2,36E-04	8,45E-04	1,29
contig_12784	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	atp1a1	2,40E-04	8,45E-04	1,27
contig_9080	Ras-related protein Rab-38	rab38	2,40E-04	8,45E-04	1,35
contig_9635	Vitelline membrane outer layer protein 1 homolog	vmo1	2,43E-04	8,48E-04	0,56
contig_3345	Complement component C8 beta chain	c8b	2,53E-04	8,74E-04	0,78
contig_16496	Four and a half LIM domains protein 1	fhl1	2,62E-04	8,99E-04	1,3
contig_5034	Prefoldin subunit 6	pfdn6	2,92E-04	9,91E-04	0,69
contig_20831	UBX domain-containing protein 7	ubxn7	2,98E-04	1,00E-03	0,72
contig_30553	ATP-binding cassette sub-family D member 4	abcd4	3,54E-04	0,00118	1,33
contig_35073	Krueppel-like factor 12	klf12	3,69E-04	0,00122	0,65
contig_19304	Protein Hook homolog 3	hook3	3,79E-04	0,00124	0,76
contig_14844	Putative sodium-coupled neutral amino acid transporter 10	slc38a10	3,86E-04	0,00126	1,31
contig_1726	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1-interacting protein 3	nkain3	4,04E-04	0,00131	1,94
contig_25585	Erlin-1	erlin1	4,33E-04	0,00139	1,29
contig_39162	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2	rrm2	4,45E-04	0,00142	1,31
contig_22784	Cystathionine gamma-lyase	cth	4,55E-04	0,00144	0,71
contig_19209	CUE domain-containing protein 1	cuedc1	5,18E-04	0,00162	1,35
contig_35673	Tribbles homolog 3	trib3	5,34E-04	0,00166	0,75
contig_26373	Proliferation-associated protein 2G4	pa2g4	6,43E-04	0,00198	0,85
contig_18321	Plexin-A3	plxNA3	6,71E-04	0,00205	0,82

Suite

contig_17878	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform type 2	mylpf	6,81E-04	0,00207	0,83
contig_36682	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	mt-nd5	7,49E-04	0,00225	1,3
contig_4845	Guanylate cyclase soluble subunit beta-1	gucy1b3	7,50E-04	0,00225	1,24
contig_21146	Forkhead box protein N3	foxn3	7,92E-04	0,00235	1,19
contig_36176	Methyl-CpG-binding domain protein 3	mbd3	8,66E-04	0,00255	1,2
contig_31893	Protein RUFY3	rufy3	9,45E-04	0,00277	1,55
contig_26556	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	map3k1	1,02E-03	2,96E-03	0,8
contig_2996	Threonine synthase-like 2	thnsl2	1,10E-03	3,16E-03	1,31
contig_25453	Ribosomal protein S6 kinase alpha-6	rps6ka6	1,14E-03	3,26E-03	1,34
contig_39463	Chymotrypsin-like elastase family member 2A	cela2a	1,34E-03	3,80E-03	0,83
contig_32813	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	uba52	1,34E-03	3,80E-03	1,29
contig_9226	Transketolase-like protein 2	tktl2	1,41E-03	3,96E-03	1,32
contig_19700	Cathepsin E-A	ctse-a	1,54E-03	4,28E-03	1,25
contig_16088	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	serbp1	1,63E-03	4,52E-03	0,81
contig_12038	Protein disulfide-isomerase	p4hb	1,71E-03	4,70E-03	1,31
contig_7786	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone), mitochondrial	dhodh	1,86E-03	5,07E-03	1,34
contig_14469	WD repeat-containing protein 5	wdr5	1,90E-03	5,15E-03	0,78
contig_3639	Malate dehydrogenase, mitochondrial	mdh2	2,01E-03	5,41E-03	0,87
contig_39900	Folliculin-interacting protein 1	fnip1	2,08E-03	5,57E-03	0,85
contig_18999	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 W	ube2w	2,19E-03	5,82E-03	0,86
contig_35830	F-box only protein 44	fbxo44	2,66E-03	7,01E-03	1,25
contig_22142	Protein FAM65A	fam65a	2,78E-03	7,28E-03	0,74
contig_16136	Probable E3 ubiquitin-protein ligase RNF217	rnf217	2,87E-03	7,46E-03	1,29
contig_3586	FAST kinase domain-containing protein 1	fastkd1	2,90E-03	7,46E-03	0,86
contig_40149	ETS-related transcription factor Elf-2	elf2	2,90E-03	7,46E-03	0,76
contig_1345	Guanine nucleotide-binding protein-like 3	gnl3	3,02E-03	7,67E-03	1,34
contig_15155	Complement C3	c3	3,02E-03	7,67E-03	1,27

Suite

contig_18706	Disabled homolog 2	dab2	3,08E-03	7,76E-03	0,86
contig_18942	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 21	tnfrsf21	3,21E-03	8,04E-03	0,86
contig_27094	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	zc3h13	3,35E-03	8,33E-03	0,79
contig_35100	Protein 4.1	epb41	3,36E-03	8,33E-03	0,83
contig_25859	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 1	kank1	3,71E-03	9,13E-03	1,32
contig_30016	Versican core protein	vcn	3,79E-03	9,28E-03	0,83
contig_14465	E1A-binding protein p400	ep400	4,14E-03	1,00E-02	0,83
contig_6438	Chymotrypsin-C	ctrc	4,15E-03	1,00E-02	1,23
contig_15859	Rho GTPase-activating protein 18	arhgap18	4,63E-03	1,11E-02	1,62
contig_36376	STIP1 homology and U box-containing protein 1	stub1	4,82E-03	1,15E-02	1,46
contig_3237	DDB1- and CUL4-associated factor 15	dcaf15	4,96E-03	1,18E-02	0,83
contig_14082	DnaJ homolog subfamily A member 4	dNAja4	5,05E-03	1,19E-02	1,26
contig_15675	Phosphoglycerate mutase 1	pgam1	5,11E-03	1,19E-02	0,86
contig_20925	Deoxynucleotidyltransferase terminal-interacting protein 2	dnttip2	5,12E-03	1,19E-02	1,15
contig_19223	Nuclear pore complex protein Nup88	nup88	5,70E-03	1,32E-02	0,84
contig_19554	Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 1	magi1	5,91E-03	1,35E-02	0,84
contig_23213	Poly(U)-specific endoribonuclease-C	endouc	5,92E-03	1,35E-02	1,28
contig_32001	nuclear cap-binding protein subunit 1	ncbp1	5,93E-03	1,35E-02	1,16
contig_7952	WD repeat-containing protein 55	wdr55	6,11E-03	1,38E-02	0,77
contig_20877	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha	pi4ka	6,37E-03	1,43E-02	1,25
contig_22875	DNA polymerase epsilon subunit 3	pole3	6,82E-03	1,53E-02	1,34
contig_12547	Minor histocompatibility antigen H13	hm13	7,30E-03	1,63E-02	1,33
contig_30327	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX10	ddx10	7,37E-03	1,63E-02	0,81

Suite

contig_2529	Vesicle-associated membrane protein 7	vamp7	7,80E-03	1,72E-02	1,33
contig_21235	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase eta-1	plch1	8,36E-03	1,83E-02	1,18
contig_15310	Dehydrogenase/reductase SDR family member 7	dhhs7	8,40E-03	1,83E-02	1,21
contig_16785	Ankyrin repeat and BTB/POZ domain-containing protein 1	abtb1	8,64E-03	1,87E-02	0,83
contig_30724	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10	tnfsf10	8,74E-03	1,88E-02	0,83
contig_16318	Krueppel-like factor 9	klf9	8,97E-03	1,92E-02	0,75
contig_26719	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	psmd14	8,98E-03	1,92E-02	1,22
contig_12470	Forkhead box protein P4	foxp4	9,33E-03	1,98E-02	0,82
contig_9484	Polycomb protein eed	eed	9,72E-03	2,05E-02	0,86

Annexe 2: List of the 112 genes that were differentially transcribed in liver of fish exposed to cold temperature and controls. Results are presented as mean fold change where experimental fish were compared to control eels (i.e. unexposed fish). Analyses were carried out by means of the class comparison tool available in the BRB array tools software ($P < 0.01$).

Probe name	Gene name	gene abbreviation	ANOVA		Fold-change
			FDR	pvalue	
contig_29875	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	prkdc	0,000137	0,0000005	0,27
contig_35073	Krueppel-like factor 12	klf12	0,000233	0,0000017	3,19
contig_14213	Collagen alpha-2(VI) chain	col6a2	0,000356	0,0000039	0,26
contig_20736	InaD-like protein	iNAdl	0,00061	0,0000089	0,4
contig_16092	39S ribosomal protein L37, mitochondrial	mrpl37	0,000712	0,0000131	0,26
contig_1269	Pre-mRNA branch site protein p14	sf3b14	0,000712	0,0000156	0,28
contig_26781	RNA-binding protein 39	rbm39	0,00108	0,0000276	0,31
contig_28807	Period circadian protein homolog 1	per1	0,00118	0,0000344	0,48
contig_25111	Regulator of nonsense transcripts 2	upf2	0,00131	0,0000436	0,31
contig_12003	WD repeat-containing protein 37	wdr37	0,00131	0,0000499	0,27
contig_11347	Zinc finger protein 710	znf710	0,00131	0,0000528	0,25
contig_36254	Twinfilin-1	twf1	0,00131	0,0000573	2,37
contig_10692	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit gamma	camk2g	0,00169	0,0000803	2,08
contig_14369	GTP cyclohydrolase 1	gch1	0,00199	0,0001016	1,98
contig_15155	Complement C3	c3	0,00257	0,0001409	0,58
contig_13836	Tubulin alpha chain	NA	0,00267	0,000162	0,38
contig_4232	Decorin	dcn	0,00267	0,0001655	0,53
contig_6092	L-serine dehydratase/L-threonine deaminase	sds	0,00345	0,0002351	0,33
contig_24654	TATA-binding protein-associated factor 2N	taf15	0,00345	0,0002483	0,53
contig_19700	Cathepsin E-A	ctse-a	0,00345	0,0002521	0,47
contig_16496	Four and a half LIM domains protein 1	fhl1	0,00391	0,0002993	0,49
contig_33219	High mobility group protein B2	hmgb2	0,00427	0,000343	2,1
contig_35278	Serum response factor-binding protein 1	srfbp1	0,00547	0,0004595	0,34

Suite

contig_19304	Protein Hook homolog 3	hook3	0,00548	0,0004802	1,67
contig_6067	Protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha	fnta	0,00626	0,0005711	0,4
contig_2761	ATP-binding cassette sub-family A member 1	abca1	0,00633	0,000601	0,61
contig_12038	Protein disulfide-isomerase	p4hb	0,00667	0,0006573	0,51
contig_20884	Trypsin-1	prss1	0,00712	0,0007347	0,37
contig_35542	Arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein	rere	0,00712	0,0007534	0,53
contig_22796	Polyadenylate-binding protein 1	pabpc1	0,00963	0,0010723	1,55
contig_3398	Probable E3 ubiquitin-protein ligase DTX3	dtx3	0,00963	0,0010893	0,6
contig_15834	Zinc finger CCH domain-containing protein 18	zc3h18	0,00963	0,0011242	0,45
contig_26848	52 kDa repressor of the inhibitor of the protein kinase	prkrir	0,01	0,0012088	0,53
contig_33287	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J-A	eif3ja	0,0101	0,0012545	0,68
contig_20175	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX33	dhx33	0,0102	0,001302	0,4
contig_16779	snRNA-activating protein complex subunit 4	sNApc4	0,0102	0,0013389	0,53
contig_16318	Krueppel-like factor 9	klf9	0,0113	0,0015525	1,68
contig_19308	Ras-related protein R-Ras2	rras2	0,0113	0,0016105	0,5
contig_8110	Alkaline ceramidase 3	acer3	0,0113	0,0016112	0,56
contig_26596	Sortilin-related receptor	sortl1	0,0121	0,0017624	0,44
contig_20155	GTP-binding protein SAR1b	sar1b	0,0123	0,0018473	1,54
contig_16488	Matrix metalloproteinase-28	mmp28	0,0127	0,0019433	2,87
contig_16709	Golgi resident protein GCP60	acbd3	0,013	0,0020367	1,68
contig_36880	Transcription factor E2-alpha	tcf3	0,0135	0,0021929	0,64
contig_35673	Tribbles homolog 3	trib3	0,0135	0,0022467	1,7
contig_12678	Hemoglobin cathodic subunit beta	hbb2	0,0135	0,0022599	1,64
contig_26223	Mothers against decapentaplegic homolog 6	smad6	0,014	0,0023935	0,58
contig_1345	Guanine nucleotide-binding protein-like 3	gnl3	0,0158	0,0027616	0,62
contig_30016	Versican core protein	vcn	0,0162	0,0028914	1,66
contig_9226	Transketolase-like protein 2	tktl2	0,0183	0,0033552	0,64
contig_21805	Coiled-coil domain-containing protein 43	ccdc43	0,0183	0,0034034	1,61

Suite

contig_39162	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2	rrm2	0,019	0,0035981	0,51
contig_20831	UBX domain-containing protein 7	ubxn7	0,0193	0,0037767	1,98
contig_30553	ATP-binding cassette sub-family D member 4	abcd4	0,0193	0,0038404	0,57
contig_2284	Protein arginine N-methyltransferase 7	prmt7	0,0193	0,0038681	0,64
contig_14467	Cyclin-I	ccni	0,0208	0,0042704	1,58
contig_17878	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform type 2	mylpf	0,0208	0,0043645	1,57
contig_16406	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 1	kank1	0,0208	0,0043988	3,09
contig_28386	Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 2	hsd11b2	0,0211	0,0045633	1,44
contig_34936	Vascular endothelial growth factor A-A	vegfaa	0,0211	0,0046156	1,57
contig_34019	Serine palmitoyltransferase 2	sptlc2	0,0228	0,0050726	1,46
contig_19602	Vacuolar protein sorting-associated protein 11 homolog	vps11	0,0269	0,0061404	0,6
contig_254	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 2	arfgap2	0,0269	0,0061906	1,43
contig_18213	Leukemia inhibitory factor receptor	lifr	0,0278	0,0064876	1,46
contig_20250	Myelin expression factor 2	myef2	0,0288	0,0068623	1,37
contig_18402	Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal	eif1ax	0,0288	0,0069469	1,39
contig_19635	GTP-binding protein 1	gtpbp1	0,033	0,0080655	0,52
contig_27094	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	zc3h13	0,0343	0,0085018	1,48
contig_9255	Tryptophan 2,3-dioxygenase A	tdo2a	0,0373	0,0093977	0,65
contig_9997	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13	adamts13	0,04	0,0102204	1,45
contig_11861	Retinol-binding protein 2	rbp2	0,0412	0,0107676	1,45
contig_26357	Integral membrane protein 2A	itm2a	0,0412	0,0108212	0,61
contig_39502	CAP-Gly domain-containing linker protein 1	clip1	0,053	0,0141197	0,56
contig_155	Protein canopy homolog 2	cnpy2	0,0534	0,0144244	0,67
contig_36998	MAP kinase-activated protein kinase 2	mapkapk2	0,0536	0,0146583	0,59
contig_39706	Protein sel-1 homolog 1	sel1l	0,0537	0,0150114	1,34
contig_19459	Stromal cell-derived factor 2-like protein 1	sdf2l1	0,0537	0,0152977	0,67
contig_23669	Netrin receptor UNC5C	unc5c	0,0537	0,0153769	1,48
contig_16563	Putative ribosomal RNA methyltransferase NOP2	nop2	0,0537	0,0154936	0,6

Suite

contig_4515	COP9 signalosome complex subunit 3	cops3	0,0541	0,015807	0,62
contig_27134	Ras-related protein Rab-1A	rab1a	0,0565	0,0167374	1,54
contig_15675	Phosphoglycerate mutase 1	pgam1	0,0565	0,016901	1,34
contig_19495	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	psmd12	0,0585	0,0177265	1,84
contig_14264	Rho guanine nucleotide exchange factor 16	arhgef16	0,0588	0,0180131	0,65
contig_19263	Protein RTF2 homolog	rtfdc1	0,0605	0,0187817	1,61
contig_36261	Beta,beta-carotene 9',10'-oxygenase	bco2	0,0619	0,0194181	1,56
contig_18384	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	psmd7	0,062	0,0196923	0,55
contig_4845	Guanylate cyclase soluble subunit beta-1	gucy1b3	0,069	0,0221693	0,57
contig_35629	NXPE family member 3	nxpe3	0,073	0,0237256	0,63
contig_35595	SH2 domain-containing protein 5	sh2d5	0,0747	0,0247364	1,37
contig_9334	SH2 domain-containing protein 1A	sh2d1a	0,0747	0,0248244	0,68
contig_771	mRNA-capping enzyme	rngtt	0,0766	0,0257198	0,71
contig_31637	DNA damage-inducible transcript 4-like protein	ddit4l	0,086	0,0292049	0,75
contig_30561	Clathrin heavy chain 1	cltc	0,088	0,0301899	1,42
contig_19237	SH2 domain-containing adapter protein F	shf	0,0911	0,0315973	1,79
contig_1439	Tight junction protein ZO-2	tjp2	0,0946	0,033132	1,57
contig_3781	Replication factor C subunit 3	rfc3	0,0959	0,0339422	1,46
contig_19306	Eukaryotic translation initiation factor 4E transporter	eif4enif1	0,0959	0,0342848	0,69
contig_21930	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase CYLD	cyld	0,101	0,036612	1,36
contig_1859	Cytohesin-2	cyth2	0,108	0,0395333	1,68
contig_36682	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	mt-nd5	0,108	0,03976	0,6
contig_26556	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	map3k1	0,108	0,0403864	1,69
contig_14185	Desmoglein-2	dsg2	0,109	0,0409165	0,56
contig_20751	PAB-dependent poly(A)-specific ribonuclease subunit 3	pan3	0,111	0,042422	0,64
contig_18558	Protein furry homolog	fry	0,111	0,0425668	1,26
contig_3639	Malate dehydrogenase, mitochondrial	mdh2	0,111	0,0434102	1,27
contig_14959	Solute carrier family 22 member 23	slc22a23	0,111	0,0434665	0,69

Suite

contig_21237	Interleukin-11 receptor subunit alpha	il11ra	0,111	0,0441196	0,67
contig_39463	Chymotrypsin-like elastase family member 2A	cela2a	0,111	0,0442258	1,38
contig_22265	U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein	u2surp	0,114	0,0460399	1,97
contig_16088	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	serbp1	0,114	0,0461385	1,36
contig_21146	Forkhead box protein N3	foxn3	0,117	0,0480027	0,72

Informations complémentaires au chapitre 5

Annexes 1: List of the 106 genes that were differentially transcribed in fin of fish exposed to PCBs-contaminated food at 50 ng.g⁻¹. Results are presented as mean fold change where experimental fish were compared to control eels (i.e. unexposed fish). Analyses were carried out by means of the class comparison tool available in the BRB array tools software (P<0.05).

Probe name	Gene name	gene abbreviation	ANOVA		Fold-change
			FDR	pvalue	
contig_22182	Transmembrane protein 106C	tmem106c	< 1e-07	< 1e-07	0,24
contig_22368	Splicing factor 3B subunit 5	sf3b5	< 1e-07	< 1e-07	3,67
contig_27654	Rho GTPase-activating protein 21	arhgap21	0,0000104	0,0000001	4,91
contig_22142	Protein FAM65A	fam65a	0,0000312	0,0000004	3,48
contig_33270	Forkhead box protein A1-A	foxa1-a	0,000406	0,0000078	2,36
contig_34962	Carboxypeptidase N subunit 2	cpn2	0,000406	0,0000088	0,3
contig_16088	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	serbp1	0,000406	0,0000091	0,42
contig_12784	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	atp1a1	0,00044	0,0000126	0,28
contig_24629	Coiled-coil domain-containing protein 6	ccdc6	0,00044	0,0000127	0,4
contig_7147	Kynurenine--oxoglutarate transaminase 3	ccbl2	0,000459	0,0000147	5,03
contig_21237	Interleukin-11 receptor subunit alpha	il11ra	0,00142	0,0000501	2,22
contig_14823	Protein phosphatase PTC7 homolog	pptc7	0,00189	0,0000733	0,26
contig_11607	REST corepressor 3	rcor3	0,00189	0,0000786	0,45
contig_29875	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	prkdc	0,00259	0,0001233	2,14
contig_22383	Solute carrier family 35 member G1	slc35g1	0,00259	0,0001247	2,93
contig_35073	Krueppel-like factor 12	klf12	0,00269	0,0001392	0,36
contig_10692	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit gamma	camk2g	0,00269	0,0001468	0,49
contig_26781	RNA-binding protein 39	rbm39	0,00274	0,0001583	1,94
contig_23841	Gap junction alpha-3 protein	gja3	0,00283	0,0001777	0,49
contig_14643	High affinity nerve growth factor receptor	ntrk1	0,00283	0,0001815	2,55
contig_19905	Kinesin-like protein KIF21A	kif21a	0,00313	0,0002104	0,48
contig_35595	SH2 domain-containing protein 5	sh2d5	0,00315	0,0002224	0,46
contig_28807	Period circadian protein homolog 1	per1	0,00328	0,000242	2,08

Suite

contig_19237	SH2 domain-containing adapter protein F	shf	0,00349	0,0002686	0,3
contig_11440	D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase, mitochondrial	d2hgdh	0,00403	0,0003229	2,01
contig_27116	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 13	med13	0,00429	0,0003571	0,52
contig_36682	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	mt-nd5	0,00504	0,0004477	0,51
contig_19223	Nuclear pore complex protein Nup88	nup88	0,00504	0,0004525	0,49
contig_7669	Complement component C7	c7	0,00564	0,0005239	0,47
contig_6543	NEDD4-like E3 ubiquitin-protein ligase WWP1	wwp1	0,00596	0,0005735	0,51
contig_11240	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13-A	map3k13-a	0,00611	0,0006067	1,87
contig_20831	UBX domain-containing protein 7	ubxn7	0,00661	0,0006784	0,49
contig_34936	Vascular endothelial growth factor A-A	vegfaa	0,00671	0,00071	0,51
contig_18354	Phospholipase B1, membrane-associated	plb1	0,00723	0,0007875	0,39
contig_34019	Serine palmitoyltransferase 2	sptlc2	0,00746	0,0008373	0,57
contig_16720	Influenza virus NS1A-binding protein homolog A	ivns1abpa	0,00773	0,0009097	0,54
contig_1859	Cytohesin-2	cyth2	0,00773	0,000917	0,55
contig_19434	Prolactin regulatory element-binding protein	preb	0,00883	0,0010752	0,45
contig_21121	Tandem C2 domains nuclear protein	tc2n	0,00989	0,0012358	0,54
contig_27094	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	zc3h13	0,0111	0,0014266	0,58
contig_13946	Enhancer of polycomb homolog 1	epc1	0,0117	0,0015665	0,42
contig_23669	Netrin receptor UNC5C	unc5c	0,0117	0,0015772	0,57
contig_7786	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone), mitochondrial	dhodh	0,0122	0,0016818	0,43
contig_12038	Protein disulfide-isomerase	p4hb	0,0154	0,0021788	1,82
contig_38960	Endophilin-A3	sh3gl3	0,0203	0,0029417	0,43
contig_35353	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like protein	gpd1l	0,0203	0,0029973	0,41
contig_19700	Cathepsin E-A	ctse-a	0,0216	0,0032941	0,38
contig_38699	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2	slc38a2	0,0216	0,0033274	0,54
contig_36005	Cyclin-T2	ccnt2	0,0217	0,0034064	0,54
contig_30561	Clathrin heavy chain 1	cltc	0,0221	0,0035459	0,59
contig_17067	Plastin-3	pls3	0,023	0,0037965	0,56

Suite

contig_35673	Tribbles homolog 3	trib3	0,023	0,003828	0,51
contig_21146	Forkhead box protein N3	foxn3	0,0257	0,0043587	0,5
contig_12678	Hemoglobin cathodic subunit beta	hbb2	0,0259	0,0044887	0,6
contig_22265	U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein	u2surp	0,0274	0,0048238	0,4
contig_39706	Protein sel-1 homolog 1	sel1l	0,0317	0,0056852	0,6
contig_22231	Transcription factor MafB	mafb	0,0367	0,0066978	2,33
contig_16318	Krueppel-like factor 9	klf9	0,0367	0,0068291	0,6
contig_15323	Collagen alpha-1(I) chain	col1a1	0,0405	0,0076613	1,81
contig_16496	Four and a half LIM domains protein 1	fhl1	0,0456	0,0088665	1,56
contig_26563	E3 ubiquitin-protein ligase AMFR	amfr	0,0456	0,0090581	0,63
contig_16406	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 1	kank1	0,0456	0,0090588	0,33
contig_39463	Chymotrypsin-like elastase family member 2A	cela2a	0,047	0,0094938	0,54
contig_18402	Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal	eif1ax	0,0512	0,0104958	0,68
contig_3781	Replication factor C subunit 3	rfc3	0,0514	0,0107095	0,65
contig_11347	Zinc finger protein 710	znf710	0,0519	0,0109836	1,63
contig_35542	Arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein	rere	0,0525	0,0114384	0,67
contig_9484	Polycomb protein eed	eed	0,0525	0,0114424	1,8
contig_10339	Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic	mars	0,0559	0,0123712	0,65
contig_19889	LIM domain transcription factor LMO4.2	lmo4.2	0,0583	0,0130795	0,61
contig_21523	DNA-binding protein inhibitor ID-4	id4	0,0605	0,0138105	0,56
contig_30553	ATP-binding cassette sub-family D member 4	abcd4	0,0605	0,0139572	1,5
contig_22784	Cystathionine gamma-lyase	cth	0,0611	0,0143027	0,62
contig_23213	Poly(U)-specific endoribonuclease-C	endouc	0,0732	0,0173532	1,62
contig_12470	Forkhead box protein P4	foxp4	0,0789	0,0190469	1,46
contig_17374	Alpha-methylacyl-CoA racemase	amacr	0,0789	0,0192126	1,51
contig_30695	Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 1	katNAL1	0,0802	0,0197862	1,44
contig_34934	Inositol hexakisphosphate kinase 2	ip6k2	0,0858	0,0216639	0,67
contig_7230	Scavenger receptor class A member 3	scara3	0,0858	0,0217528	1,52

Suite

contig_25742	Surfeit locus protein 4	surf4	0,0858	0,0221468	1,64
contig_10659	Ras-related protein Rab-4B	rab4b	0,0858	0,0223183	0,61
contig_4248	Deoxyribonuclease gamma	dNAse1l3	0,0858	0,0225452	0,7
contig_2258	LON peptidase N-terminal domain and RING finger protein 1	lonrf1	0,0864	0,0229828	0,56
contig_16181	MARVEL domain-containing protein 2	marveld2	0,0874	0,0235344	1,76
contig_9635	Vitelline membrane outer layer protein 1 homolog	vmo1	0,0921	0,0251041	0,61
contig_21579	Nuclear RNA export factor 1	nxf1	0,0994	0,0274107	0,67
contig_15834	Zinc finger CCCH domain-containing protein 18	zc3h18	0,101	0,0283219	1,42
contig_20337	Tetratricopeptide repeat protein 4	ttc4	0,101	0,0284955	0,63
contig_14152	Coagulation factor X	f10	0,106	0,0305043	1,7
contig_8110	Alkaline ceramidase 3	acer3	0,106	0,0305135	1,42
contig_13944	IQ domain-containing protein D	iqcd	0,106	0,0308101	0,69
contig_21815	Cofilin-2	cfl2	0,106	0,0312396	1,86
contig_20925	Deoxynucleotidyltransferase terminal-interacting protein 2	dnttip2	0,106	0,0317834	0,52
contig_25588	Transmembrane protein 208	tmem208	0,106	0,0319212	1,44
contig_16092	39S ribosomal protein L37, mitochondrial	mrpl37	0,108	0,0328886	0,67
contig_39502	CAP-Gly domain-containing linker protein 1	clip1	0,112	0,0345235	0,67
contig_18907	Transmembrane emp24 domain-containing protein 7	tmed7	0,112	0,0347187	1,48
contig_20250	Myelin expression factor 2	myef2	0,116	0,0370442	0,73
contig_39164	Synapse-associated protein 1	syap1	0,116	0,0372892	0,7
contig_27318	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 45	usp45	0,116	0,0373326	1,55
contig_18119	Cleavage stimulation factor subunit 2	cstf2	0,119	0,0384299	1,63
contig_26556	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	map3k1	0,119	0,0388886	0,69
contig_12608	Integrin alpha-V	itgav	0,122	0,0402268	0,68
contig_8217	Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein 3	lrch3	0,124	0,0417278	1,62
contig_155	Protein canopy homolog 2	cnpy2	0,124	0,0417464	1,59
contig_26307	Proteasome subunit beta type-1-A	psmb1-a	0,139	0,047389	0,69

Annexe 2: List of the 26 genes that were differentially transcribed in fin of fish exposed to PCBs-contaminated food at 300 ng.g⁻¹. Results are presented as mean fold change where experimental fish were compared to control eels (i.e. unexpsoed fish). Analyses were carried out by means of the class comparison tool available in the BRB array tools software ($P < 0.05$).

Probe name	Gene name	gene abbreviation	ANOVA		Fold-change
			FDR	pvalue	
contig_28807	Period circadian protein homolog 1	per1	0,001	0,000	2,480
contig_19308	Ras-related protein R-Ras2	rras2	0,001	0,000	2,720
contig_15323	Collagen alpha-1(I) chain	col1a1	0,002	0,000	2,930
contig_8110	Alkaline ceramidase 3	acer3	0,054	0,001	1,870
contig_35979	PRKCA-binding protein	pick1	0,228	0,005	1,690
contig_7225	Phosphatidylethanolamine-binding protein 4	pebp4	0,228	0,005	0,410
contig_25544	ADP-ribosylation factor-like protein 4A	arl4a	0,228	0,007	0,460
contig_22265	U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein	u2surp	0,228	0,008	0,590
contig_35073	Krueppel-like factor 12	klf12	0,228	0,009	0,420
contig_16779	snRNA-activating protein complex subunit 4	sNApc4	0,228	0,009	1,680
contig_36880	Transcription factor E2-alpha	tcf3	0,228	0,010	1,520
contig_6451	Claudin-7-B	cldn7b	0,228	0,010	0,470
contig_3781	Replication factor C subunit 3	rfc3	0,336	0,016	1,450
contig_14369	GTP cyclohydrolase 1	gch1	0,338	0,017	0,670
contig_36254	Twinfilin-1	twf1	0,347	0,020	0,670
contig_10339	Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic	mars	0,347	0,020	0,700
contig_1439	Tight junction protein ZO-2	tjp2	0,356	0,023	0,640
contig_39242	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 8	entpd8	0,356	0,023	0,520
contig_9226	Transketolase-like protein 2	tktl2	0,390	0,027	1,520
contig_18999	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 W	ube2w	0,399	0,032	1,380
contig_36215	Tropomyosin alpha-3 chain	tpm3	0,399	0,032	0,530
contig_39706	Protein sel-1 homolog 1	sel1l	0,399	0,032	0,680
contig_20831	UBX domain-containing protein 7	ubxn7	0,413	0,035	1,460
contig_2761	ATP-binding cassette sub-family A member 1	abca1	0,458	0,042	1,520
contig_22182	Transmembrane protein 106C	tmem106c	0,458	0,042	1,430
contig_20751	PAB-dependent poly(A)-specific ribonuclease subunit 3	pan3	0,502	0,048	0,580

Annexe 3: List of the 72 genes that were differentially transcribed in fin of fish exposed to dissolved Cd at 4 µg.L⁻¹. Results are presented as mean fold change where experimental fish were compared to control eels (i.e. unexposed fish). Analyses were carried out by means of the class comparison tool available in the BRB array tools software ($P < 0.05$).

Probe name	Gene name	gene abbreviation	ANOVA		Fold-change
			FDR	pvalue	
contig_12784	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	atp1a1	0,000	0,000	0,370
contig_16488	Matrix metalloproteinase-28	mmp28	0,000	0,000	0,230
contig_19308	Ras-related protein R-Ras2	rras2	0,001	0,000	2,370
contig_16406	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 1	kank1	0,001	0,000	0,210
contig_15323	Collagen alpha-1(I) chain	col1a1	0,002	0,000	2,960
contig_24629	Coiled-coil domain-containing protein 6	ccdc6	0,005	0,000	0,480
contig_18174	Ankyrin-2	ank2	0,005	0,000	0,270
contig_34962	Carboxypeptidase N subunit 2	cpn2	0,005	0,000	0,400
contig_4579	39S ribosomal protein L3, mitochondrial	mrpl3	0,005	0,000	3,520
contig_22265	U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein	u2surp	0,006	0,000	0,440
contig_14737	Luc7-like protein 3	luc7l3	0,007	0,000	0,340
contig_33173	Zinc transporter ZIP6	slc39a6	0,011	0,000	2,130
contig_19237	SH2 domain-containing adapter protein F	shf	0,016	0,001	0,490
contig_26553	Mitochondrial Rho GTPase 1-A	rhot1a	0,020	0,001	2,420
contig_21028	V-type proton ATPase subunit B	atp6v1b	0,025	0,001	0,460
contig_7786	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone), mitochondrial	dhodh	0,027	0,001	0,510
contig_21146	Forkhead box protein N3	foxn3	0,027	0,001	0,570
contig_36838	Peroxiredoxin-1	prdx1	0,027	0,001	2,450
contig_10751	Clathrin light chain A	clta	0,027	0,001	2,130
contig_36682	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	mt-nd5	0,038	0,002	0,600
contig_20155	GTP-binding protein SAR1b	sar1b	0,039	0,002	1,770
contig_23259	Nardilysin	nrd1	0,046	0,003	2,400
contig_11817	Dual specificity protein phosphatase 4	dusp4	0,051	0,003	1,830
contig_17521	Zinc transporter ZIP13	slc39a13	0,053	0,003	1,680
contig_32111	Endoplasmic reticulum mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase	man1b1	0,053	0,003	1,640
contig_17374	Alpha-methylacyl-CoA racemase	amacr	0,070	0,005	1,540
contig_19889	LIM domain transcription factor LMO4.2	lmo4.2	0,072	0,005	0,630

Suite

contig_25859	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 1	kank1	0,074	0,005	1,570
contig_19209	CUE domain-containing protein 1	cuedc1	0,074	0,005	1,970
contig_18354	Phospholipase B1, membrane-associated	plb1	0,082	0,006	0,580
contig_14264	Rho guanine nucleotide exchange factor 16	arhgef16	0,086	0,007	1,520
contig_3958	Exostosin-like 3	extl3	0,088	0,007	0,380
contig_16779	snRNA-activating protein complex subunit 4	sNApc4	0,092	0,008	1,670
contig_12608	Integrin alpha-V	itgav	0,099	0,008	1,520
contig_19700	Cathepsin E-A	ctse-a	0,101	0,009	0,630
contig_31505	Fibrillin-2	fbn2	0,101	0,009	0,590
contig_14959	Solute carrier family 22 member 23	slc22a23	0,107	0,010	0,640
contig_9226	Transketolase-like protein 2	tktl2	0,107	0,010	1,740
contig_28807	Period circadian protein homolog 1	per1	0,107	0,011	1,530
contig_2761	ATP-binding cassette sub-family A member 1	abca1	0,107	0,011	1,540
contig_36046	UPF0461 protein C5orf24 homolog	zgc:77058	0,107	0,011	1,570
contig_17499	Rab11 family-interacting protein 4A	rab11fip4a	0,107	0,011	0,640
contig_15923	Hepatic leukemia factor	hlf	0,108	0,012	1,640
contig_1857	Transmembrane protein 241	tmem241	0,115	0,013	1,690
contig_23213	Poly(U)-specific endoribonuclease-C	endouc	0,116	0,013	1,420
contig_24191	Microsomal triglyceride transfer protein large subunit	mttp	0,121	0,014	1,780
contig_9484	Polycomb protein eed	eed	0,121	0,014	1,630
contig_20900	Kinase suppressor of Ras 1	ksr1	0,121	0,014	2,230
contig_14369	GTP cyclohydrolase 1	gch1	0,123	0,015	0,650
contig_14823	Protein phosphatase PTC7 homolog	pptc7	0,136	0,017	1,620
contig_16883	Protein catecholamines up	catsup	0,146	0,018	1,590
contig_39706	Protein sel-1 homolog 1	sel1l	0,153	0,020	0,670
contig_20925	Deoxynucleotidyltransferase terminal-interacting protein 2	dnttip2	0,179	0,023	0,660
contig_38657	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	hnrnpl	0,205	0,028	0,660
contig_18206	Carbohydrate sulfotransferase 15	chst15	0,205	0,028	0,670
contig_22182	Transmembrane protein 106C	tmem106c	0,206	0,029	0,690
contig_18384	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	psmd7	0,206	0,029	1,430
contig_38699	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2	slc38a2	0,206	0,029	0,680
contig_21804	Endoplasmic	hsp90b1	0,209	0,031	1,490

Suite					
contig_9568	Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating]	qprt	0,209	0,031	1,550
contig_1950	Calcium-regulated heat stable protein 1	carhsp1	0,234	0,035	1,700
contig_6291	Phosphoserine aminotransferase	psat1	0,234	0,036	1,670
contig_16181	MARVEL domain-containing protein 2	marveld2	0,242	0,037	1,550
contig_10339	Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic	mars	0,248	0,039	0,730
contig_20884	Trypsin-1	prss1	0,252	0,040	1,420
contig_13946	Enhancer of polycomb homolog 1	epc1	0,252	0,042	0,690
contig_20877	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha	pi4ka	0,252	0,043	0,710
contig_9819	Chymotrypsin-like elastase family member 2A	cela2a	0,252	0,043	1,760
contig_17146	Aldose 1-epimerase	galm	0,252	0,043	1,480
contig_33270	Forkhead box protein A1-A	foxa1-a	0,252	0,043	1,510
contig_36254	Twintilin-1	twf1	0,280	0,049	0,710

Annexe 4: List of the 77 genes that were differentially transcribed in liver of fish exposed to dissolved Cd at 4 µg.L⁻¹. Results are presented as mean fold change where experimental fish were compared to control eels (i.e. unexpsoed fish). Analyses were carried out by means of the class comparison tool available in the BRB array tools software (P < 0.05).

Probe name	Gene name	gene abbreviation	ANOVA		Fold-change
			<i>FDR</i>	pvalue	
contig_14467	Cyclin-I	ccni	0,007	0,000	1,940
contig_15859	Rho GTPase-activating protein 18	arhgap18	0,007	0,000	0,300
contig_28585	Ankyrin repeat and KH domain-containing protein 1	ankhd1	0,007	0,000	5,400
contig_19237	SH2 domain-containing adapter protein F	shf	0,007	0,000	0,340
contig_18907	Transmembrane emp24 domain-containing protein 7	tmed7	0,019	0,000	1,980
contig_16133	Probable helicase with zinc finger domain	helz	0,020	0,000	0,410
contig_18206	Carbohydrate sulfotransferase 15	chst15	0,020	0,001	0,610
contig_35198	RNA-binding protein EWS	ewsr1	0,020	0,001	3,590
contig_34936	Vascular endothelial growth factor A-A	vegfaa	0,020	0,001	0,620
contig_11440	D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase, mitochondrial	d2hgdh	0,020	0,001	1,750
contig_16318	Krueppel-like factor 9	klf9	0,026	0,001	1,650
contig_12608	Integrin alpha-V	itgav	0,026	0,001	0,590
contig_39060	Serine/threonine-protein kinase 17A	stk17a	0,034	0,001	1,780
contig_18055	Histone RNA hairpin-binding protein	slbp	0,050	0,002	1,910
contig_20155	GTP-binding protein SAR1b	sar1b	0,050	0,002	1,700
contig_9484	Polycomb protein eed	eed	0,050	0,002	1,710
contig_28030	Forkhead box protein L2	foxl2	0,050	0,002	1,880
contig_13098	78 kDa glucose-regulated protein	hspa5	0,050	0,002	1,770
contig_33460	Ribonuclease inhibitor	rnhi	0,051	0,003	0,430
contig_9255	Tryptophan 2,3-dioxygenase A	tdo2a	0,051	0,003	1,760
contig_15825	Ankyrin repeat domain-containing protein 13C	ankrd13c	0,051	0,003	2,570
contig_12470	Forkhead box protein P4	foxp4	0,051	0,003	1,540
contig_35073	Krueppel-like factor 12	klf12	0,051	0,003	0,520

Suite

contig_36261	Beta,beta-carotene 9',10'-oxygenase	bco2	0,055	0,004	1,740
contig_5818	1,25-dihydroxyvitamin D(3) 24-hydroxylase, mitochondrial	cyp24a1	0,055	0,004	2,080
contig_19700	Cathepsin E-A	ctse-a	0,056	0,004	1,590
contig_26186	Leukocyte elastase inhibitor	serpinb1	0,056	0,004	1,610
contig_19495	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	psmd12	0,060	0,005	2,180
contig_14486	Coatomer subunit gamma-2	copg2	0,060	0,005	1,610
contig_35100	Protein 4.1	epb41	0,074	0,006	1,490
contig_30841	Protein atonal homolog 8	atoh8	0,074	0,006	0,640
contig_14152	Coagulation factor X	f10	0,075	0,007	2,000
contig_2344	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha	chuk	0,108	0,010	1,610
contig_37915	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 5	enpp5	0,116	0,011	1,940
contig_254	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 2	arfgap2	0,116	0,011	0,680
contig_32220	Dihydropyrimidinase	dpys	0,121	0,012	1,660
contig_18503	Protein DGCR6	dgcr6	0,121	0,012	1,620
contig_20175	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX33	dhx33	0,127	0,014	1,760
contig_28658	Tuftelin	tuft1	0,127	0,014	0,390
contig_2266	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	prkdc	0,127	0,014	0,670
contig_11191	Sorting nexin-27	snx27	0,140	0,016	1,680
contig_26373	Proliferation-associated protein 2G4	pa2g4	0,140	0,017	1,450
contig_3656	Integrin-linked protein kinase	ilk	0,140	0,017	2,560
contig_22555	Rho guanine nucleotide exchange factor 1	arhgef1	0,140	0,017	0,540
contig_31300	Retinoic acid receptor RXR-beta-A	rxrba	0,142	0,018	0,380
contig_18304	E3 ubiquitin-protein ligase RNF123-like	NA	0,142	0,018	2,150
contig_9512	UPF0462 protein C4orf33 homolog	zgc:77739	0,142	0,019	1,620
contig_16181	MARVEL domain-containing protein 2	marveld2	0,142	0,019	1,840
contig_22784	Cystathionine gamma-lyase	cth	0,142	0,020	1,460
contig_39900	Folliculin-interacting protein 1	fnip1	0,142	0,020	1,370
contig_4477	Protein dispatched homolog 1	disp1	0,142	0,020	1,630

Suite

contig_25669	Sortilin-related receptor	sorl1	0,142	0,021	0,710
contig_3237	DDB1- and CUL4-associated factor 15	dcaf15	0,143	0,021	1,360
contig_36998	MAP kinase-activated protein kinase 2	mapkapk2	0,147	0,022	1,670
contig_13946	Enhancer of polycomb homolog 1	epc1	0,157	0,024	1,450
contig_2245	Calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1A	pde1a	0,161	0,025	1,400
contig_24638	T-complex protein 1 subunit delta	cct4	0,167	0,026	1,730
contig_1847	Probable arginine--tRNA ligase, mitochondrial	rars2	0,171	0,028	1,430
contig_22142	Protein FAM65A	fam65a	0,171	0,028	1,840
contig_12003	WD repeat-containing protein 37	wdr37	0,171	0,028	1,670
contig_17878	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform type 2	mylpf	0,175	0,030	0,730
contig_2232	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	arnt	0,175	0,030	1,380
contig_5034	Prefoldin subunit 6	pfdn6	0,194	0,034	1,410
contig_21561	Metalloreductase STEAP3	steap3	0,194	0,035	0,740
contig_12784	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	atp1a1	0,194	0,035	0,760
contig_32125	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	hadh	0,195	0,036	0,760
contig_24468	Transmembrane 9 superfamily member 2	tm9sf2	0,195	0,036	1,640
contig_29875	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	prkdc	0,198	0,037	1,590
contig_14469	WD repeat-containing protein 5	wdr5	0,209	0,040	1,360
contig_15323	Collagen alpha-1(I) chain	col1a1	0,211	0,041	1,380
contig_3586	FAST kinase domain-containing protein 1	fastkd1	0,214	0,043	0,740
contig_1859	Cytohesin-2	cyth2	0,214	0,044	0,610
contig_21858	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	mapre1	0,214	0,044	1,630
contig_2761	ATP-binding cassette sub-family A member 1	abca1	0,214	0,044	0,760
contig_16779	snRNA-activating protein complex subunit 4	sNApc4	0,214	0,045	1,410
contig_18402	Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal	eif1ax	0,214	0,046	0,760
contig_8827	Transmembrane protease serine 3	tmprss3	0,214	0,046	1,450

Annexe 5: List of the 93 genes that were differentially transcribed in fin of wild fish from Gironde in comparison to control fish. Results are presented as mean fold change where wild fish from Gironde were compared to control eels (i.e. unexposed fish). Analyses were carried out by means of the class comparison tool available in the BRB array tools software ($P < 0.05$).

Probe name	Gene name	gene abbreviation	ANOVA		Fold-change
			FDR	pvalue	
contig_18942	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 21	tnfrsf21	0.00148	0.0000094	0.49
contig_36682	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	mt-nd5	0.00148	0.0000172	0.13
contig_33270	Forkhead box protein A1-A	foxa1-a	0.00148	0.0000184	1.34
contig_22142	Protein FAM65A	fam65a	0.00148	0.0000204	2.49
contig_7695	40S ribosomal protein S13	rps13	0.00244	0.000042	0.19
contig_30695	Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 1	katNAL1	0.0081	0.000176	3.34
contig_22368	Splicing factor 3B subunit 5	sf3b5	0.0081	0.0001954	5.83
contig_32813	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	uba52	0.00854	0.0002558	0.33
contig_36005	Cyclin-T2	ccnt2	0.00854	0.0002651	0.46
contig_27654	Rho GTPase-activating protein 21	arhgap21	0.0102	0.0003836	2.45
contig_1439	Tight junction protein ZO-2	tjp2	0.0102	0.0003885	0.055
contig_12608	Integrin alpha-V	itgav	0.0109	0.0004495	0.54
contig_14486	Coatamer subunit gamma-2	copg2	0.0112	0.0005212	3.26
contig_18402	Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal	eif1ax	0.0112	0.0005415	0.4
contig_20014	Hepatocyte nuclear factor 4-beta	hnf4b	0.0147	0.0007601	0.43
contig_6543	NEDD4-like E3 ubiquitin-protein ligase WWP1	wwp1	0.0272	0.0014998	0.94
contig_22182	Transmembrane protein 106C	tmem106c	0.0293	0.0017202	0.54
contig_36998	MAP kinase-activated protein kinase 2	mapkapk2	0.0304	0.0018847	2.66
contig_11347	Zinc finger protein 710	znf710	0.0316	0.0021321	0.76
contig_25588	Transmembrane protein 208	tmem208	0.0316	0.0022295	1.69
contig_32125	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	hadh	0.0316	0.0024359	0.25
contig_6451	Claudin-7-B	cldn7b	0.0316	0.0025542	3.38

Suite

contig_36215	Tropomyosin alpha-3 chain	tpm3	0.0316	0.0025641	0.12
contig_8217	Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein 3	lrch3	0.0316	0.0026185	2.78
contig_17374	Alpha-methylacyl-CoA racemase	amacr	0.0319	0.0029671	2.74
contig_20925	Deoxynucleotidyltransferase terminal-interacting protein 2	dnthp2	0.0319	0.0029787	0.35
contig_32275	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA43	twistnb	0.0319	0.0030743	0.25
contig_24629	Coiled-coil domain-containing protein 6	ccdc6	0.0319	0.0030841	0.34
contig_36880	Transcription factor E2-alpha	tcf3	0.038	0.0038873	2.32
contig_38960	Endophilin-A3	sh3gl3	0.038	0.0039332	0.058
contig_18070	Kinectin	ktn1	0.0423	0.0046178	1.62
contig_15834	Zinc finger CCCH domain-containing protein 18	zc3h18	0.0423	0.0046668	1.33
contig_34883	Alpha-2-macroglobulin-like protein 1	a2ml1	0.0425	0.004839	1.29
contig_15113	THAP domain-containing protein 4	thap4	0.0505	0.0059201	2.66
contig_19700	Cathepsin E-A	ctse-a	0.0511	0.0061678	0.87
contig_14264	Rho guanine nucleotide exchange factor 16	arhgef16	0.0513	0.0063669	1.79
contig_39706	Protein sel-1 homolog 1	sel1l	0.052	0.0066335	0.48
contig_4074	Proteasome subunit beta type-8	psmb8	0.0583	0.0076349	0.25
contig_19308	Ras-related protein R-Ras2	rras2	0.0589	0.0079869	7.94
contig_22265	U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein	u2surp	0.0589	0.0082215	1.71
contig_23213	Poly(U)-specific endoribonuclease-C	endouc	0.0589	0.0085066	5.86
contig_18434	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1	irak1	0.0589	0.0086182	1.08
contig_151	Bestrophin-1	best1	0.0589	0.0087318	1.14
contig_16406	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 1	kank1	0.0629	0.0096304	1.54
contig_37808	Oxysterol-binding protein-related protein 1	osbp1a	0.0629	0.0097592	1.62
contig_19905	Kinesin-like protein KIF21A	kif21a	0.0656	0.0104002	0.63
contig_15155	Complement C3	c3	0.07	0.0113522	0.27
contig_35100	Protein 4.1	epb41	0.0765	0.01267	2.28
contig_14512	PERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 2	gigyf2	0.0776	0.013115	0.25

Suite

contig_26307	Proteasome subunit beta type-1-A	psmb1-a	0.0787	0.0135752	0.84
contig_12678	Hemoglobin cathodic subunit beta	hbb2	0.0802	0.0142341	0.55
contig_16318	Krueppel-like factor 9	klf9	0.0802	0.0148438	2.87
contig_9484	Polycomb protein eed	eed	0.0802	0.0148794	1.83
contig_771	mRNA-capping enzyme	rngtt	0.0802	0.0149274	0.37
contig_3781	Replication factor C subunit 3	rfc3	0.0813	0.0154269	0.66
contig_33319	Ran-specific GTPase-activating protein	ranbp1	0.0829	0.0160073	1.34
contig_35112	Spartin	spg20	0.0841	0.016539	0.6
contig_30338	Gem-associated protein 6	gemin6	0.0913	0.018252	2.79
contig_25669	Sortilin-related receptor	sorl1	0.107	0.0218054	0.73
contig_18321	Plexin-A3	plxNA3	0.107	0.0221832	1.22
contig_24654	TATA-binding protein-associated factor 2N	taf15	0.107	0.0227498	1.31
contig_12003	WD repeat-containing protein 37	wdr37	0.107	0.0227836	2.09
contig_33173	Zinc transporter ZIP6	slc39a6	0.107	0.0234894	2.73
contig_4161	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1 homolog	cyfip1	0.107	0.0237288	0.47
contig_9568	Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating]	qprt	0.107	0.0239987	0.51
contig_17499	Rab11 family-interacting protein 4A	rab11fip4a	0.107	0.0242936	3.05
contig_16488	Matrix metalloproteinase-28	mmp28	0.107	0.024932	1.12
contig_14467	Cyclin-I	ccni	0.107	0.0255335	3.27
contig_21815	Cofilin-2	cfl2	0.107	0.0255403	0.24
contig_35542	Arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein	rere	0.108	0.0259682	0.35
contig_2298	Dexamethasone-induced Ras-related protein 1	rasd1	0.111	0.0275117	3.8
contig_33287	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J-A	EIF3JA	0.111	0.0275805	1.24
contig_4477	Protein dispatched homolog 1	disp1	0.114	0.0285902	0.25
contig_39164	Synapse-associated protein 1	syap1	0.116	0.0297253	0.75
contig_17146	Aldose 1-epimerase	galM	0.118	0.031227	2.55
contig_15310	Dehydrogenase/reductase SDR family member 7	dhfr7	0.118	0.0312634	1.36

Suite

contig_27011	Protein RCC2 homolog	rcc2	0.118	0.0312684	0.78
contig_22414	Adrenodoxin, mitochondrial	fdx1	0.12	0.0322976	2.02
contig_15072	BCL-6 corepressor	bcor	0.121	0.0328989	0.93
contig_22231	Transcription factor MafB	mafb	0.122	0.0336776	2.06
contig_10659	Ras-related protein Rab-4B	rab4b	0.122	0.0339949	0.42
contig_23841	Gap junction alpha-3 protein	gja3	0.124	0.0349908	0.76
contig_3371	Poly(U)-specific endoribonuclease	endou	0.126	0.0363637	1.27
contig_26848	52 kDa repressor of the inhibitor of the protein kinase	prkir	0.126	0.0365094	0.29
contig_18055	Histone RNA hairpin-binding protein	slbp	0.127	0.0372955	1.76
contig_20877	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha	pi4ka	0.131	0.0392228	0.56
contig_39242	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 8	entpd8	0.131	0.0395651	0.46
contig_20831	UBX domain-containing protein 7	ubxn7	0.131	0.039658	0.98
contig_10692	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit gamma	camk2g	0.134	0.0412475	0.66
contig_254	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 2	arfgap2	0.138	0.0429244	0.56
contig_25742	Surfeit locus protein 4	surf4	0.138	0.0434199	4.89
contig_36254	Twinfilin-1	twf1	0.155	0.0495763	2.33
contig_18558	Protein furry homolog	fry	0.155	0.0497235	1.84

Annexe 6: List of the 37 genes that were commonly affected in fin of fish exposed to PCBs at 50 ng.g-1 dw and fish from Gironde in comparison to control fish. Results are presented as mean fold change where fish experimentally exposed to Cd or wild fish from Gironde were compared to control eels (i.e. unexposed fish). Analyses were carried out by means of the class comparison tool available in the BRB array tools software ($P < 0.05$).

Probe name	Gene name	gene abbreviation	ANOVA <i>pvalue</i>		PCB_170 Fold-change	Gironde Fold-change
			PCB_170	Gironde		
contig_22368	Splicing factor 3B subunit 5	sf3b5	< 1e-07	0.000	5.73	5.83
contig_22142	Protein FAM65A	fam65a	0.000	0.000	1.21	2.49
contig_27654	Rho GTPase-activating protein 21	arhgap21	0.000	0.000	3.27	2.45
contig_22182	Transmembrane protein 106C	tmem106c	0.000	0.002	0.78	0.54
contig_24629	Coiled-coil domain-containing protein 6	ccdc6	0.000	0.003	0.36	0.34
contig_33270	Forkhead box protein A1-A	foxa1-a	0.000	0.000	1.3	1.34
contig_6543	NEDD4-like E3 ubiquitin-protein ligase WWP1	wwp1	0.000	0.001	1.09	0.94
contig_9484	Polycomb protein eed	eed	0.000	0.015	10.82	1.83
contig_23213	Poly(U)-specific endoribonuclease-C	endouc	0.001	0.009	8.33	5.86
contig_36682	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	mt-nd5	0.001	0.000	0.23	0.13
contig_15834	Zinc finger CCH domain-containing protein 18	zc3h18	0.001	0.005	0.76	1.33
contig_20831	UBX domain-containing protein 7	ubxn7	0.001	0.040	0.86	0.98
contig_23841	Gap junction alpha-3 protein	gja3	0.001	0.035	0.71	0.76
contig_19905	Kinesin-like protein KIF21A	kif21a	0.001	0.010	0.85	0.63
contig_10692	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit gamma	camk2g	0.004	0.041	1.06	0.66
contig_22231	Transcription factor MafB	mafb	0.005	0.034	2.12	2.06
contig_32813	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	uba52	0.008	0.000	1.15	0.33
contig_25742	Surfeit locus protein 4	surf4	0.009	0.043	3.53	4.89
contig_17374	Alpha-methylacyl-CoA racemase	amacr	0.010	0.003	2.6	2.74
contig_18321	Plexin-A3	plxNA3	0.011	0.022	1.08	1.22
contig_12608	Integrin alpha-V	itgav	0.017	0.000	0.87	0.54
contig_38960	Endophilin-A3	sh3gl3	0.019	0.004	0.19	0.058
contig_11347	Zinc finger protein 710	znf710	0.019	0.002	0.47	0.76
contig_24654	TATA-binding protein-associated factor 2N	taf15	0.023	0.023	0.88	1.31

Suite

contig_33287	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J-A	eif3ja	0.024	0.028	0.93	1.24
contig_19700	Cathepsin E-A	ctse-a	0.026	0.006	0.2	0.87
contig_151	Bestrophin-1	best1	0.026	0.009	0.81	1.14
contig_15072	BCL-6 corepressor	bcor	0.029	0.033	0.91	0.93
contig_16406	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 1	kank1	0.030	0.010	0.059	1.54
contig_8217	Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein 3	lrch3	0.030	0.003	1.39	2.78
contig_36005	Cyclin-T2	ccnt2	0.031	0.000	1.01	0.46
contig_30338	Gem-associated protein 6	gemin6	0.032	0.018	1.59	2.79
contig_4161	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1 homolog	cyfip1	0.034	0.024	1.71	0.47
contig_39706	Protein sel-1 homolog 1	sel1l	0.037	0.007	1.14	0.48
contig_30695	Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 1	katNAL1	0.043	0.000	1.45	3.34
contig_22265	U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein	u2surp	0.047	0.008	0.13	1.71
contig_20925	Deoxynucleotidyltransferase terminal-interacting protein 2	dnttip2	0.047	0.003	0.64	0.35

Annexe 7: List of the 19 genes that were commonly affected in fin of fish exposed to dissolved Cd at 4 µg.L⁻¹ and fish from Gironde in comparison to control fish. Results are presented as mean fold change where fish experimentally exposed to Cd or wild fish from Gironde were compared to control eels (i.e. unexposed fish). Analyses were carried out by means of the class comparison tool available in the BRB array tools software ($P < 0.05$).

Probe name	Gene name	gene abbreviation	ANOVA <i>pvalue</i>		Cd_4 Fold-change	Gironde Fold-change
			Cd_4	Gironde		
contig_16488	Matrix metalloproteinase-28	mmp28	0.000	0.025	0.052	1.12
contig_19308	Ras-related protein R-Ras2	rras2	0.000	0.008	9.49	7.94
contig_16406	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 1	kank1	0.000	0.010	0.033	1.54
contig_24629	Coiled-coil domain-containing protein 6	ccdc6	0.000	0.003	0.45	0.34
contig_23213	Poly(U)-specific endoribonuclease-C	endouc	0.000	0.009	6.9	5.86
contig_17374	Alpha-methylacyl-CoA racemase	amacr	0.001	0.003	2.71	2.74
contig_36682	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	mt-nd5	0.001	0.000	0.26	0.13
contig_22265	U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein	u2surp	0.002	0.008	0.12	1.71
contig_14264	Rho guanine nucleotide exchange factor 16	arhgef16	0.002	0.006	0.91	1.79
contig_12608	Integrin alpha-V	itgav	0.003	0.000	2.02	0.54
contig_9484	Polycomb protein eed	eed	0.003	0.015	8.2	1.83
contig_9568	Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating]	qppt	0.006	0.024	2.36	0.51
contig_33173	Zinc transporter ZIP6	slc39a6	0.012	0.023	1.99	2.73
contig_25742	Surfeit locus protein 4	surf4	0.021	0.043	2.87	4.89
contig_39706	Protein sel-1 homolog 1	sel1l	0.024	0.007	1.12	0.48
contig_36215	Tropomyosin alpha-3 chain	tpm3	0.026	0.003	0.59	0.12
contig_33270	Forkhead box protein A1-A	foxa1-a	0.032	0.000	0.9	1.34
contig_17499	Rab11 family-interacting protein 4A	rab11fip4a	0.034	0.024	0.92	3.05
contig_15834	Zinc finger CCCH domain-containing protein 18	zc3h18	0.048	0.005	0.57	1.33

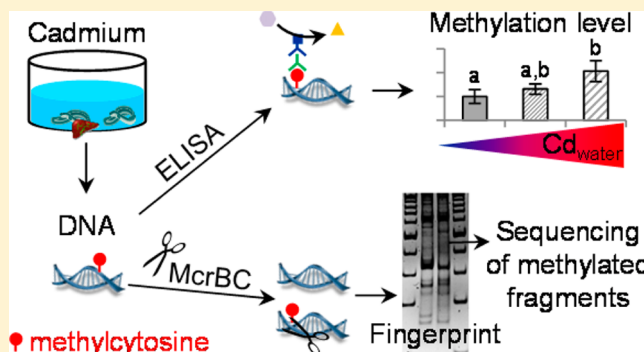
Effect of Low-Dose Cadmium Exposure on DNA Methylation in the Endangered European Eel

Fabien Pierron,^{*,†,‡} Lucie Baillon,^{†,‡} Mohamedou Sow,^{†,‡} Salomé Gotreau,^{†,‡} and Patrice Gonzalez^{†,‡}

[†]Université de Bordeaux, EPOC, UMR 5805, F-33400 Talence, France

[‡]CNRS, EPOC, UMR 5805, F-33400 Talence, France

ABSTRACT: There is increasing evidence that epigenetics can play a key role in the etiology of diseases engendered by chronic pollutant exposure. Although epigenetics has received significant attention in the field of biomedicine during the last years, epigenetics research is surprisingly very limited in ecotoxicology. The aim of the present study was to investigate the possible effects of low-dose cadmium exposure on the DNA methylation profile in a critically endangered fish species, the European eel. Eels were exposed to environmentally realistic concentrations of cadmium (0.4 and $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) during 45 days. The global CpG methylation status of eel liver was determined by means of a homemade ELISA assay. We then used a methylation-sensitive arbitrarily primed PCR method to identify genes that are differentially methylated between control and Cd-exposed eels. Our results show that cadmium exposure is associated with DNA hypermethylation and with a decrease in total RNA synthesis. Among hypermethylated sequences identified, several fragments presented high homologies with genes encoding for proteins involved in intracellular trafficking, lipid biosynthesis, and phosphatidic acid signaling pathway. In addition, few fragments presented high homologies with retrotransposon-like sequences. Our study illustrates how DNA methylation can be involved in the chronic stress response to Cd in fish.



1. INTRODUCTION

Epigenetics is the study of changes in gene function that are mitotically and/or meiotically heritable and that do not entail a change in DNA code.^{1–3} One of the most studied epigenetic processes is DNA methylation. DNA methylation, which refers to the addition of a methyl group to cytosine to form the 5-methylcytosine base, is commonly associated with “gene silencing”, i.e. transcriptional repression (with few exceptions; see Vandegehuchte and Janssen, 2011¹). In mammals and plants, for which significant research was carried out, DNA methylation was found to be involved in fundamental biological functions such as development, cell differentiation and chromosome stability. In recent years, the role of epigenetics in the etiology of human diseases, especially carcinogenesis, has received increasing attention. Recent discoveries have shown that environmental factors, such as nutrition quality or exposure to pollutants, can strongly affect the epigenetic status of mammalian cells. These defects or unintended changes in the DNA methylation status can be associated with negative health outcomes such as embryonic lethality, tumor genesis, diabetes, and infertility.^{2,4–6} There is thus increasing evidence that adverse effects engendered by chronic exposure to pollutants, even at very low concentrations, are linked to epigenetic modifications in mammals.³ Despite such evidence, epigenetics research is surprisingly very limited in ecotoxicology. As a major aim of ecotoxicology is to measure and predict the effects of

contaminants on natural populations, communities, and ecosystems, the study of epigenetics in an ecotoxicological context appears to be highly relevant.

Therefore, the aim of the present study was to investigate the potential impacts of cadmium (Cd) exposure on the DNA methylation profile in an endangered fish species, the European eel *Anguilla anguilla*. Cd is a widespread nonessential and highly toxic trace metal. Cd is known to be a mutagenic metal and to induce apoptosis and oxidative stress.⁷ Anthropogenic activities such as mining or ore treatment have greatly increased the global flux of Cd in the Earth’s surficial environment leading to elevated concentrations in the environment, notably in aquatic systems. Historically abundant and widespread in Europe, European eel recruitment has suffered a sharp decline since early 1980s. European eel’s recruitment would represent now only one tenth of what it was in the early 1980s.⁸ In view of these data, the European eel is currently considered as critically endangered and is listed on the red list of threatened species. There is now some evidence that pollution, among other factors, could contribute to the dramatic decline of the species. Their unusual and complex life cycle makes them indeed

Received: October 30, 2013

Revised: December 12, 2013

Accepted: December 13, 2013

Published: December 13, 2013

particularly vulnerable to pollution.^{9–12} Thus, the European eel can be considered as a sentinel species in ecotoxicology and could provide a model to explore recent hypotheses that human activities have led to a tremendous decrease in aquatic biodiversity in the last century.¹³

To test whether chronic Cd exposure could induce changes in the DNA methylation profile in a nonmodel but ecologically relevant species, European eels were exposed to dissolved Cd at environmentally realistic concentrations ($[\text{Cd}]_{\text{water}} = 0.4$ and $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) for 45 days.¹⁴ Thereafter, the global CpG methylation status of liver of both control and Cd-exposed eels was determined by means of a homemade ELISA assay. In order to identify and characterize genes and, by extension, biological processes, that are differentially methylated between control and Cd-exposed eels, we used a methylation-sensitive arbitrarily primed PCR (msAP-PCR) method, the McrBC-msAP-PCR method.¹⁵ Finally, the transcription level of genes identified by this method was determined by quantitative RT-PCR.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Experimental Design. All procedures used in this experiment were approved by the Aquitaine fish-birds ethic committee. Immature yellow eels (*Anguilla anguilla*), averaging 37 cm in length and 70 g in weight (36.9 ± 2.5 cm and 70.4 ± 2.4 g, respectively, mean \pm SE, $n = 24$) were captured in the Arcachon Bay (southwest of France) in May 2012. The animals were transferred to the laboratory (Marine Biology Station of Arcachon) and kept in running aerated brackish water (salinity 5‰, natural seawater dilution with aerated tap water) thermostatted at 23 °C over a 1-month maintenance period, prior to experimentation. Over this period, fish were fed every day with mussels, and no lethality was observed.

The experiment was performed by means of a flow-through system consisting of three separate 215 L experimental units (EU). Each tank was supplied with brackish water (salinity = 5‰) by three water flowmeters and contained eight organisms. Fish in the first EU were in uncontaminated water and constituted control animals. In the two other tanks, fish were exposed to Cd at a dissolved metal concentration of 0.4 and $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Metal exposure was initiated after one month of adaptation to the experimental conditions by adding Cd as CdCl_2 from a stock solution in water. To maintain constant Cd contamination over time, contaminated tanks were fitted with a peristaltic pump which added Cd at the desired concentration. During the experiment, the water column was permanently controlled for temperature (23 ± 1 °C), pH (7.7 ± 0.1), and salinity (4.85 ± 0.7). Moreover, water samples were collected three times a week. After acidification and dilution, they were checked in Cd concentration, and flows were adjusted if necessary. The average concentrations were $0.09 \pm 0.01 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.43 \pm 0.03 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, and $4.00 \pm 0.18 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (mean \pm SE, $n = 12$) in control and contaminated tanks, respectively. During the 45 days of exposure, eels were fed every evening in excess (7.5% wet weight animal/day) with artificial food (fresh fish flesh mixed with oil (1.3%) and agar–agar (0.8%)).

At the end of the exposure period, 5 eels per EU were removed and dissected. Two samples of liver were immediately fixed in RNAlater solution and stored at -20 °C until needed for analyses.

2.2. DNA Purification. Genomic DNA from liver tissue was isolated by overnight digestion with proteinase K, followed by standard phenol/chloroform/isoamyl alcohol extraction and ethanol precipitation. The pellet was resuspended in 100 μL of

TE solution and treated with RNase A ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) at 37 °C during 1 h. DNA was *de novo* treated with phenol/chloroform and precipitated with absolute ethanol. The pellet was resuspended in 100 μL of TE.

2.3. Global CpG Methylation Assay. In order to facilitate maximum binding of DNA, 96-well polystyrene microplates (Greiner-bio-one) were incubated overnight at 4 °C with 200 μL per well of a 0.1% aqueous solution of protamine sulfate (Sigma). The plates were then emptied by simple inversion and washed five times with 200 μL of ultrapure Milli-Q water. These coated plates were then dried at 37 °C for 10 min and stored at 4 °C in dark before use.

To establish a standard curve, DNA from several eels was treated with CpG methyltransferase M.SssI (New England Biolabs) according to manufacturer instructions. Briefly, 1 μL of DNA solution at 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ was incubated at 37 °C for 1 h 30 min with 2 μL of SAM at 32 mM, 2 μL of 10X NEBuffer, 1 μL of SssI methylase at 4 U/ μL , and 14 μL of nuclease free water. Methylated DNA was then isolated and purified by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. Methylated DNA was evaluated by spectrophotometry (Take3, Epoch, Biotek). DNA standard was diluted with TE to obtain a standard solution at 10 ng/ μL . The solution was then aliquoted in 0.5 mL tubes and stored at -20 °C until needed.

Two hundred microliters of standard solutions containing 8, 20, 40, 100, and 200 ng of methylated-DNA as well as DNA samples containing 200 ng of DNA were heated at 94 °C for 2 min and immediately cooled in ice. Then, 50 μL of heat-treated DNA was added in the desired number of wells and incubated 1 h at 37 °C. After DNA attachment, wells were washed five times with 200 μL of PBS (NaCl 0.14 M, Na_2HPO_4 0.01M, pH 7.3). To diminish nonspecific antibody binding, each well was then filled with 200 μL of PBS-BSA solution (2% BSA), and the plate was incubated 1 h at 37 °C. The plate was then washed five times with PBS. Primary antibodies, i.e. anti-5-methylcytosine monoclonal antibody (Epigentek), were diluted with PTB-BSA solution (PBS solution with BSA 2% and Tween-20 0.02%) at a final concentration of 0.5 ng/ μL . Wells were then filled with 50 μL of primary antibody solution, and the plate was incubated 1 h at 37 °C. After incubation, the plate was washed three-times with PTB solution (PBS solution with Tween-20 at 0.02%) followed by two-times with PBS. Secondary antibodies, i.e. Goat anti-Mouse IgG1 Antibody HRP Conjugated (Bethyl), were diluted with PTB-BSA solution at a final concentration of 0.2 ng/ μL . Wells were then filled with 50 μL of secondary antibody solution, and the plate was incubated 30 min at 37 °C. After incubation, the plate was washed three-times with PTB solution followed by two-times with PBS. Then, 150 μL of TMB solution (Pierce) was added to each well, and the plate was incubated 2 min at room temperature. The reaction was stopped by the addition of 50 μL of H_2SO_4 at 2 N. The absorbance was then read at 450 nm.

2.4. McrBC-msAP-PCR. The protocol described by Tryndyak et al. (2006) was used. Briefly, 20 μg of genomic DNA was digested overnight at 37 °C with 5 U· μg^{-1} by McrBC endonuclease (New England Biolabs). McrBC-digested DNA fragments were then separated on a 0.8% agarose gel electrophoresis. Fragments larger than 1 Kbp were purified by means of the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. These fragments were then digested overnight at 25 °C with 20 U· μg^{-1} of methylation-sensitive restriction endonuclease *SmaI* endonuclease (New England Biolabs). The reaction was stopped by

heat treatment (65 °C, 25 min). Then, fragments were digested overnight at 37 °C with 40 U·μg⁻¹ by *HpaII* (New England Biolabs). For all enzymatic reactions, reactions were stopped by heat treatment (65 °C, 25 min) and freezing (-20 °C). Digested DNA fragments were PCR-amplified ((95 °C 30 s, 40 °C 60 s, 72 °C 90 s) × 5 cycles; followed by (95 °C 15 s, 55 °C 15 s, 72 °C 60 s) × 30 cycles) using 50 pmol of a single primer; MLG2 (5'-AACCCCTCACCCCTAACCCCGGG-3'). PCR products were resolved on 5% polyacrylamide gel. Bands presenting different intensities among fish groups (Control and Cd-exposed eels) were excised. DNA was then extracted by a crush and soak method before to be PCR-amplified as described above. PCR products were purified from a 0.8% agarose gel electrophoresis by means of the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Purified fragments were then cloned using a pGEM-T easy vector system (Promega) according to the manufacturer's instructions. Selected clones were sequenced (GATC Biotech). Sequence homologies were searched using the Blast+ program using the *Anguilla japonica* database.¹⁶

2.5. Quantitative RT-PCR. For each gene, specific primers were determined (Table 1) using the Primer3Plus software and

Table 1. Specific Primer Pairs Used in Quantitative Real Time PCR Analysis

gene name	primer sequences
<i>β-actin</i>	CAGCCTTCCTTCCTGGGT ^a AGTATTTGCGTCGGGTG ^b
<i>arf1</i>	GCTGCTGAAAAACAACCAT ^a CTAGTAGAACGGCTCTCGG ^b
<i>kif21a</i>	CATCTGCTTCATCAGACGGA ^a GACTACGAGAAGCGGCTGAC ^b
<i>agpat4</i>	CATCTGCTTCATCAGACGGA ^a GACTACGAGAAGCGGCTGAC ^b
<i>line-1</i>	CGTCGCCTGTTCCATATTCT ^a AGCAGACAGTGGACAGCCTT ^b
18s	CATGGCCGTTCTTAGTTGGT ^a CTCTAAGAAGTTGGACGCCG ^b

^aForward primer. ^bReverse primer.

EEelBase.¹⁷ Total RNA was extracted from 20 mg of liver (20.41 ± 0.84 mg, mean ± SE, *n* = 15) and treated with DNaseI using the Absolutely RNA Miniprep Kit (Agilent), according to the manufacturer's instructions. For each sample, RNA quality was evaluated by electrophoresis on a 1% agarose gel, and RNA concentrations as well as purity were determined by spectrophotometry (Take3, Epoch, Biotek). First-strand cDNA was then synthesized from 1 μg of total RNA using the GoScript Reverse Transcription System (Promega), according to the manufacturer's instructions. Following the reverse transcriptase reaction, cDNA was diluted 10-fold. Real-time PCR reactions were then performed in an MX3000P (Stratagene; 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s). Each 20 μL reaction contained 12.5 μL of GoTaq qPCR master mix (Promega), 5 μL of template, and the specific primer pairs at a final concentration of 250 nM each. Amplification efficiencies for all primer sets were calculated; all values proved to be sufficient to allow direct comparison of amplification plots according to the ΔΔCt method.¹⁸ Relative quantification of gene expression was achieved by concurrent amplification of the *β-actin* endogenous control. Hence, during our experiment, total RNAs were quantified, and 1 μg was used to be reverse-

transcribed. During the subsequent qPCR amplifications, the output cycle corresponding to the *β-actin* was examined. This output was always obtained around the same output cycle; i.e. 21.87 ± 0.17 (mean ± SE, *n* = 5) for control fish, 21.67 ± 0.36 (mean ± SE, *n* = 5) for Cd-exposed fish at 0.4 μg·L⁻¹, and 21.27 ± 0.57 (mean ± SE, *n* = 5) for Cd-exposed fish at 4 μg·L⁻¹, demonstrating the relevance of the *β-actin* as a reference gene in our conditions.

2.6. Statistical Analyses. Comparisons among fish groups were performed by analysis of variance (ANOVA), after checking assumptions of normality and homoscedasticity of the error terms. When the assumptions were not met as deduced graphically and from ad-hoc tests, we used log and box-cox data transformations. If significant effects were detected, the Least Square Deviation test (LSD) was used to determine whether means between pairs of samples were significantly different from one another. Computations were performed using STATISTICA version 6.1 software (StatSoft, USA). Numerical results are given as means ± SE (*n* = 5 per condition).

3. RESULTS

3.1. Effect of Cd Exposure on Global CpG Methylation Level and Total RNA Concentration. The calibration of our ELISA method is presented in Figure 1. A significant

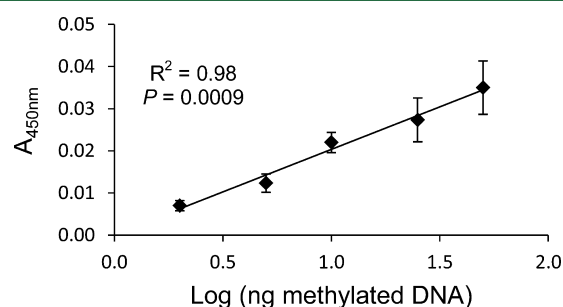


Figure 1. Linear regression of log of ng 5-methylcytosine DNA versus absorption at 450 nm (mean ± SE, *n* = 3 technical replicates, the coefficient (*R*²), and the level of significance (*P*) of the correlation are reported on the graph).

correlation (*r*² = 0.98, *P* = 0.0009) was observed between the quantity of methylated DNA and the absorbance measured at 450 nm, allowing thus to investigate a possible effect of Cd exposure on this parameter in eels. The effect of Cd exposure on the global CpG methylation status of eel's liver is presented in Figure 2A. Increasing concentrations of Cd exposure were associated with an increase in the global CpG methylation level in eels. However, this increase was only significant in the case of eels exposed to the highest concentration (i.e., [Cd]_{water} = 4 μg·L⁻¹). After 45 days of exposure, a significant 2-fold increase in global CpG methylation level was detected in the liver of fish exposed to Cd at 4 μg·L⁻¹ compared to nonexposed eels. This increase in methylation level was associated with a significant decrease in total RNA concentrations (Figure 2B). After 45 days of exposure, a significant 1.9-fold decrease in total RNA concentration was detected in the liver of fish exposed to Cd at 4 μg·L⁻¹ compared to controls. No significant effect of Cd was observed on this parameter at the lowest Cd concentration tested, i.e. 0.4 μg·L⁻¹.

3.2. Identification of Differentially Methylated Sites. The McrBC-msAP-PCR method uses three methylation-

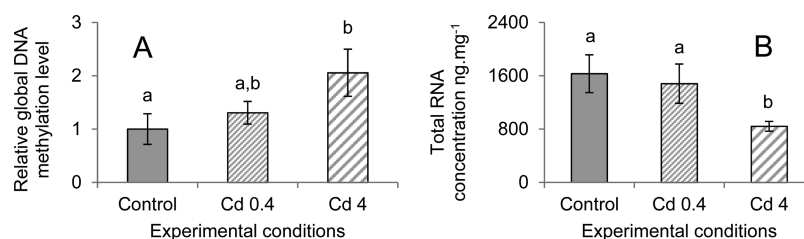


Figure 2. Change in relative global CpG methylation level (A) and in total RNA concentration (B) in liver of control and Cd exposed European eels ($[Cd]_w = 0.4$ and $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Data are expressed as mean \pm SE ($n = 5$). Bars sharing same-case letters do not differ significantly ($P > 0.05$).

specific restriction endonucleases which cleave or, on the contrary, do not cleave DNA containing 5-methylcytosine. This method was used on genomic DNA of eels in order to detect differentially methylated fragments among control and Cd-exposed eels. Using this method, hypermethylation and hypomethylation are visualized by the increase or the decrease in the band intensity of DNA fingerprints. Results are presented in Figure 3. Genomic DNA from liver of Cd-contaminated fish

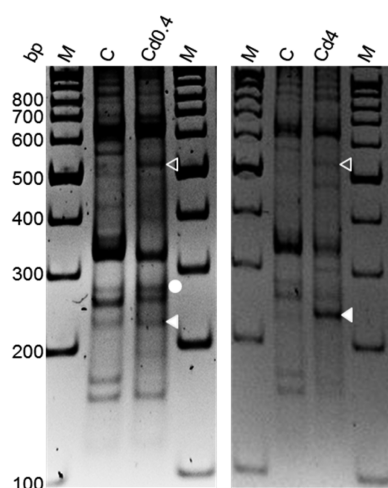


Figure 3. Representative McrBC-msAP-PCR fingerprints of control (C) and Cd-exposed eels ($[Cd]_w = 0.4$ and $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, Cd0.4 and Cd4, respectively). Bands that appeared in Cd-exposed eels and not in control eels and bands with increasing intensity of band in Cd-exposed eels compared to control eels were considered as hypermethylation. M refers to molecular marker. Open triangles refer to *kif21a*. Closed triangles refer to *agpat4*. Circle refers to *arf1*.

exhibited an emergence of novel sequences compared to control eels. A total of 24 bands that showed differential intensities were excised from the gels, reamplified, cloned, and sequenced. The resulting sequences were compared to the genome of *Anguilla japonica* using the Blast+ program on Linux.¹⁹ For sequences that showed high homologies, a portion of the *Anguilla japonica* genome containing the sequence plus 1000 bp upstream and 1000 bp downstream was compared to Genbank database using the Blast program. Only 3 fragments showed high homologies with genes of known functions. These fragments were located near or in the genes encoding for ADP-ribosylation factor 1 (ARF1), kinesin-like protein KIF21A (KIF21A), and 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase delta (AGPAT4). All these sequences presented on the gel an increase in band intensity in response to Cd exposure and can be thus considered as hypermethylated in Cd contaminated fish. Whereas *kif21a* and *agpat4* were found in both groups of Cd exposed eels, *arf1* was found only in eels exposed to the

lowest concentration tested; i.e. $0.4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Using directly the Genbank database and the Blast program, within sequences, some fragments were found to show highly significant homologies with flanking regions (noncoding regions) of retrotransposon-like sequences. Interestingly, such elements were even observed in the fragments containing the sequences of *kif21a* and *agpat4* genes (Figure 4). All these sequences were found to be hypermethylated in Cd contaminated fish.

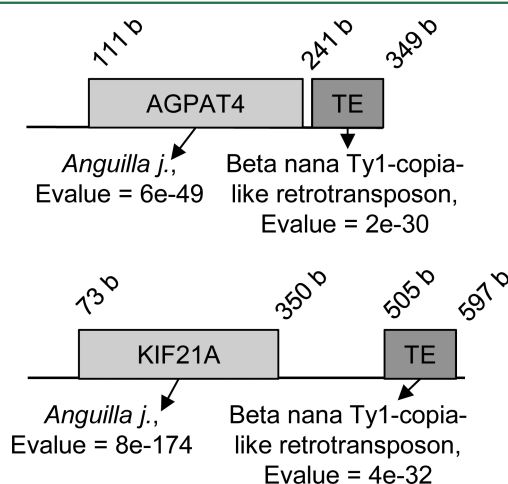


Figure 4. Schematic diagram detailing the fragments obtained by McrBC-msAP-PCR and that contain both sequences with high homology for *agpat4* and *kif21a* genes from *Anguilla japonica* and sequences with high homology for transposable elements (TE). Expect Value are indicated on the graph. These schematic diagrams were carried out using BLASTn program and MEME software.²⁰

3.3. Gene Transcription Level. To test whether changes in the DNA methylation status of fragments identified by the McrBC-msAP-PCR method could induce changes in the transcription level of the corresponding genes, specific primer pairs were designed for *kif21a*, *agpat4*, and *arf1* genes. In order to substantiate a potential effect of Cd on the methylation status and, concomitantly, on the transcription level of TEs in eel, specific primer pairs were also designed for the retrotransposon *line-1*. Among TEs, *line-1* is indeed the most abundant family of nonlong terminal repeat retrotransposons found throughout the genome. In consequence, its methylation status is often used as a proxy to assess global DNA methylation.²¹ The transcription level of these genes was then determined by quantitative RT-PCR. As a significant decrease in total RNA concentration was observed in response to Cd exposure, we also determined the transcription level of the gene encoding for 18s rRNA. Results are presented in the Figure 5A. Cd exposure at $0.4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ significantly triggered a down-regulation of the gene encoding for ARF1. A significant

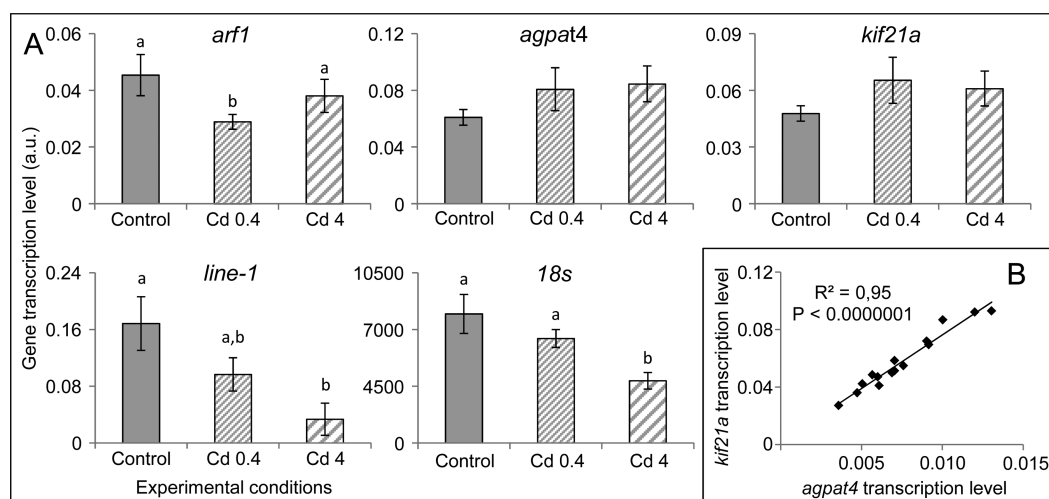


Figure 5. Effect of Cd exposure on gene transcription. (A) Change in gene transcription level (mean \pm SE; $n = 5$) in liver of control and Cd exposed European eels ($[Cd]_w = 0.4$ and $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Bars sharing same-case letters do not differ significantly ($P > 0.05$). (B) Relation between the transcription level of *kif21a* and *agpat4* ($n = 15$, the coefficient (R^2) and the level of significance (P) of the correlation are reported on the graph).

decrease in the transcription level of genes encoding for 18s and LINE-1 was also observed at the highest Cd concentration ($4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Despite a trend to increase in response to Cd exposure, no significant effect of Cd was observed on the transcription level of genes encoding for AGPAT4 and KIF21A. Interestingly, the transcription levels of these two genes were found to be highly correlated ($R^2 = 0.95$, $P < 0.0000001$, Figure 5B).

4. DISCUSSION

Our results show that low-dose exposure to Cd induced changes in the CpG methylation status of eel's hepatocytes. Cd exposure was associated with a significant increase in the global CpG methylation status of eels. Such results are consistent with previous studies carried out on human embryo lung fibroblast cells or in hens.^{5,22} For both studies, subchronic Cd exposure triggered a concentration-related increase in the global DNA methylation level. As epigenetic is still in its infancy, it is unclear why and how the genomic DNA methylation of organisms can be modified by Cd exposure. Moreover, it is also unclear if changes in DNA methylation in response to pollutant exposure represent an adaptive response to alleviate pollutant toxicity or, on the contrary, a mechanism by which pollutants exert their toxicity. For example, aberrant DNA methylation status was found to be an important factor in tumorigenesis, including in the development of hepatocellular adenoma tumors in wild fish from contaminated environments.²³ However, it was shown in numerous models that global genomic levels of DNA methylation are lower in cancer cells than in noncancer tissues.²³ As Cd is known to induce DNA damages,²⁴ an increased in global DNA methylation could aim to protect DNA and, by extension, organisms against Cd toxicity. Indeed, recent research has shown that chromatin compaction, a well-known effect of DNA methylation, protects DNA from damage.^{25,26}

Since DNA methylation is commonly associated with gene silencing,¹ we then quantified the amount of total RNA in eel liver. Our data indicate that Cd exposure induces a significant decrease in total RNA concentration. Given that rRNAs represent at least 95% of the total RNA in fish hepatocytes, such a decrease could be mainly explained by a decrease in

ribosome biosynthesis. In direct support of this hypothesis, a significant decrease in the transcription level of the 18s rRNA gene was observed in Cd-exposed eels.

In order to obtain more information about genes and, by extension, biological processes that are differentially methylated between control and Cd-exposed eels we used the McrBC-msAP-PCR method. Our results indicate that Cd exposure can modify the methylation profile of the eel genome. Three genes encoding for proteins involved in intracellular trafficking (ARF1 and KIF21A) and phospholipid biosynthetic process (AGPAT4) were found to be hypermethylated in response to Cd exposure.

For *arf1*, this gene was found to be hypermethylated only in eels exposed to the lowest Cd concentration tested, i.e. $0.4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. In accordance to an increase in its methylation status, its transcription level was found to be significantly lower in eels exposed to Cd at $0.4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Interestingly, ARF1 protein was recently found to be involved in intracellular Cd trafficking and more precisely in the transport of Cd-metallothionein complex.²⁷ Metallothioneins (MT) are cysteine-rich proteins involved in maintaining sufficient intracellular supplies of some essential metals and in detoxifying excess intracellular metals (including nonessential metals such as Cd). Using a dominant-negative mutant for *arf1* (DN-*arf1*), authors have shown that the transfer of the Cd-MT complex to lysosome can lead to cytotoxicity. Cd toxicity was indeed found to be significantly lower in DN-*arf1* than in wild type cells.²⁷ The hypermethylation of the *arf1* gene coupled with a down-regulation of its transcription level in response to metal exposure could thus appear as a defense mechanism to alleviate Cd cytotoxicity.

Concerning *kif21a* and *agpat4* genes, despite these genes being found to be hypermethylated in response to Cd exposure, no significant effect of Cd on their gene transcription levels was observed. The gene *kif21a* encodes a microtubule-binding molecular protein involved in intracellular trafficking. The gene *agpat4* encodes an enzyme involved in lipid biosynthesis (i.e., triglycerides and phospholipids). It is interesting to note that *kif21a* and *agpat4* genes, despite seeming to be involved in different biological processes, were found to be highly coexpressed, suggesting a common regulatory mechanism. This could be explained at least in part by the presence at the

genomic level of a transposable element (TE) at their proximity. TEs have long been considered as “selfish” or “parasitic” DNA elements since active TEs are known to be highly mutagenic and to impair the fitness of their host.²⁸ However, the importance of TEs in genome evolution and transcription regulation has received increasing attention in recent years. Recent discoveries have demonstrated that TEs are mostly inactive in host. Despite in most cases this being due to TE truncation, DNA methylation was found to play a key role in keeping full-length TEs transcriptionally silent. It is becoming increasingly clear that TEs play important roles in genome transcription regulation since few authors have demonstrated that the activation of TEs by stresses can change the transcriptional activity of neighboring genes.^{21,29–31} In our case, in accordance with an increase in global CpG methylation and in the methylation level of TEs in Cd-exposed eels, the transcription level of *line-1* gene was found to be down-regulated in response to Cd exposure, suggesting an effect of chronic Cd exposure on the methylation level of TEs. It is thus intriguing to speculate that dynamic DNA methylation changes within TEs in response to Cd exposure have contributed among other factors to the (co)regulation of *agpat4* and *kif21a* transcription levels. Limited evidence exists in the literature about the relationships between the methylation status of TEs and pollutant exposure or diseases (especially for Cd and fish). Moreover, data are mainly restricted to epidemiologic studies and to the cancer field.^{32,33} In most cases, TEs were found to be hypomethylated in response to pollutant (e.g., benzene, lead, traffic particles) or to biotic²⁹ exposures. The response appears thus to be different for Cd in our study. For a better understanding, it could be interesting to refer to the functions of AGPAT4 and KIF21A. The product of AGPAT4, i.e. phosphatidic acid (PA), is both a precursor of lipid biosynthesis and an emerging signaling lipid. PA is known to be involved in the regulation of diverse cellular functions in plants and animals notably intracellular trafficking but also microtubule organization, cytoskeleton reorganization, and survival signaling. In addition, it is interesting to note that proteomic investigations have shown that kinesin-like proteins (KIF proteins) are PA-binding proteins.³⁴ It could thus explain why *agpat4* and *kif21a* genes present a common pattern of gene transcription. Intracellular levels of PA are known to increase in response to abiotic stress. It has been proposed that PA is a second messenger in a broad range of stress signaling pathways and that PA mediates responses to various stresses.^{35,36} To our knowledge, there is no data on a potential role of PA signaling pathway in response to Cd exposure. As DNA methylation is commonly associated with gene silencing (with few exceptions; see Vandeghechuchte and Janssen, 2011¹), our data could indicate that chronic Cd exposure *via* DNA methylation of TEs represses this stress pathway, bringing the transcription level of *agpat4* and *kif21a* in Cd-exposed eels close to control eels. This could impair the capacity of eels to respond to Cd stress. Alternatively, such a response could correspond to the setup of an adaptive response to chronic Cd exposure. Indeed, under chronic exposure conditions, it could be difficult to maintain over time increased levels of PA, i.e. an energy-consuming stress response. In this context, it is interesting to note that Takiguchi et al.³⁷ using rat liver cells showed that whereas prolonged exposure to Cd (10 weeks) triggers DNA hypermethylation, a short-term exposure (1 week) to the same conditions induces, on the contrary, DNA hypomethylation.

Further kinetic studies are needed to test a potential effect of both acute and chronic Cd exposures on PA biosynthesis.

Our study illustrates how epigenetics and, more precisely, DNA methylation can be involved in the chronic stress response to Cd in a nonmodel fish species. Cd exposure was found to increase the global CpG methylation status of eel liver. The methylation level of three genes involved in intracellular trafficking and lipid biosynthesis was also increased in Cd-exposed eels. Two of them were associated with a TE sequence at the genomic level. This could reinforce the general hypothesis that DNA methylation of TEs could represent a widespread response to abiotic stress in eukaryotic organisms by regulating the transcription level of neighboring genes.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: 33556223927. Fax: 33556549383. E-mail: f.pierron@epoc.u-bordeaux1.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche de France (ANR Immortel ANR-10-INTB-1704) jointly funded by the Innovative Project of the UMR EPOC 5805.

REFERENCES

- (1) Vandeghechuchte, M.; Janssen, C. Epigenetics and its implications for ecotoxicology. *Ecotoxicology* **2011**, *20* (3), 607–624.
- (2) Feil, R.; Fraga, M. F. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13* (2), 97–109.
- (3) Head, J. A.; Dolinoy, D. C.; Niladri, B. Epigenetics for ecotoxicologists. *Environ. Toxicol. Chem.* **2012**, *31* (2), 221–227.
- (4) Jaenisch, R.; Bird, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* **2003**, *33*, 245–254.
- (5) Jiang, G.; Xu, L.; Song, S.; Zhu, C.; Wu, Q.; Zhang, L.; Wu, L. Effects of long-term low-dose cadmium exposure on genomic DNA methylation in human embryo lung fibroblast cells. *Toxicology* **2008**, *244* (1), 49–55.
- (6) Skinner, M. K.; Manikkam, M.; Guerrero-Bosagna, C. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends Endocrinol. Metab.* **2010**, *21* (4), 214–222.
- (7) Nair, A. R.; Degheselle, O.; Smeets, K.; Van Kerkhove, E.; Cuypers, A. Cadmium-induced pathologies: where is the oxidative balance lost (or not)? *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 6116–6143.
- (8) Stone, R. Freshwater eels are slip-sliding away. *Science* **2003**, *302* (5643), 221–22.
- (9) Robinet, T. T.; Feunteun, E. E. Sublethal effects of exposure to chemical compounds: a cause for the decline in Atlantic eels? *Ecotoxicology* **2002**, *11* (4), 265–277.
- (10) Pierron, F.; Baudrimont, M.; Bossy, A.; Bourdineaud, J.-P.; Brêthes, D.; Elie, P.; Massabuau, J.-C. Impairment of lipid storage by cadmium in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquat. Toxicol.* **2007**, *81* (3), 304–311.
- (11) Pierron, F.; Baudrimont, M.; Dufour, S.; Elie, P.; Bossy, A.; Baloché, S.; Mesmer-Dudons, N.; Gonzalez, P.; Bourdineaud, J.-P.; Massabuau, J.-C. How cadmium could compromise the completion of the European eel's reproductive migration. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 4607–4612.
- (12) Geeraerts, C.; Belpaire, C. The effects of contaminants in European eel: a review. *Ecotoxicology* **2010**, *19* (2), 239–266.
- (13) Wilson, E. O. *The Future of Life*; Knopf: New York, 2003; p 256.
- (14) Couture, P.; Busby, P.; Gauthier, C.; Rajotte, J. W.; Pyle, G. G. Seasonal and regional variations of metal contamination and condition

indicators in yellow perch (*Perca flavescens*) along two polymetallic gradients. I. Factors influencing tissue metal concentrations. *Hum. Ecol. Risk Assess.* **2008**, *14* (1), 97–125.

(15) Tryndyak, V.; Kovalchuk, O.; Pogribny, I. P. Identification of differentially methylated sites within unmethylated DNA domains in normal and cancer cells. *Anal. Biochem.* **2006**, *356* (2), 202–207.

(16) Henkel, C. V.; Dirks, R. P.; De Wijze, D. L.; Minegishi, Y.; Aoyama, J.; Jansen, H. J.; Turner, B.; Knudsen, B.; Bundgaard, M.; Hvam, K. L.; Boetzer, M.; Pirovano, W.; Weltzien, F.-A.; Dufour, S.; Tsukamoto, K.; Spink, H. P.; Van Den Thillart, G.E. First draft genome sequence of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Gene* **2012**, *511* (2), 195–201.

(17) Pujolar, J.; Marino, I.; Milan, M.; Coppe, A.; Maes, G.; Capocioni, F.; Ciccotti, E.; Bervoets, L.; Covaci, A.; Belpaire, C.; Cramb, G.; Patarnello, T.; Bargelloni, L.; Bortoluzzi, S.; Zane, L. Surviving in a toxic world: transcriptomics and gene expression profiling in response to environmental pollution in the critically endangered European eel. *BMC Genomics* **2012**, *13*, 507.

(18) Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2\Delta\Delta CT$ method. *Methods* **2001**, *25* (4), 402–408.

(19) Zhang, Z.; Schwartz, S.; Wagner, L.; Miller, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* **2000**, *7* (1–2), 203–14.

(20) Bailey, T. L.; Bodén, M.; Buske, F. A.; Frith, M.; Grant, C. E.; Clementi, L.; Ren, J.; Li, W. W.; Noble, W. S. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 202–208.

(21) Pearce, M. S.; Mcconnell, J. C.; Potter, C.; Barrett, L. M.; Parker, L.; Mathers, J. C.; Relton, C. L. Global LINE-1 DNA methylation is associated with blood glycaemic and lipid profiles. *Int. J. Epidemiol.* **2012**, *41*, 210–217.

(22) Zhang, J.; Fu, Y.; Li, J.; Wang, J.; He, B.; Xu, S. Effects of subchronic cadmium poisoning on DNA methylation in hens. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2009**, *27* (3), 345–349.

(23) Mirbahai, L.; Yin, G.; Bignell, J. P.; Li, N.; Williams, T. D.; Chipman, J. K. DNA methylation in liver tumorigenesis in fish from the environment. *Epigenetics* **2011**, *6* (11), 1319–1333.

(24) Badisa, V. L. D.; Latinwo, L. M.; Odewumi, C. O.; Ikediobi, C. O.; Badisa, R. B.; Ayuk-Takem, L. T.; Nwoga, J.; West, J. Mechanism of DNA damage by cadmium and interplay of antioxidant enzymes and agents. *Environ. Toxicol.* **2007**, *22* (2), 144–151.

(25) Choy, J. S.; Wei, S.; Lee, J. Y.; Tan, S.; Chu, S.; Lee, T.-H. DNA methylation increases nucleosome compaction and rigidity. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (6), 1782–1783.

(26) Cann, K. L.; Dellaire, G. Heterochromatin and the DNA damage response: the need to relax. *Biochem. Cell Biol.* **2011**, *89*, 45–60.

(27) Wolff, N. A.; Lee, W.-K.; Thévenod, F. Role of Arf1 in endosomal trafficking of protein-metal complexes and cadmium-metalllothionein-1 toxicity in kidney proximal tubule cells. *Toxicol. Lett.* **2011**, *203* (3), 210–218.

(28) Slotkin, R. K.; Martienssen, R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8* (4), 272–285.

(29) Dowen, R. H.; Pelizola, M.; Schmitz, R. J.; Lister, R.; Dowen, J. M.; Nery, J. R.; Dixon, J. E.; Ecker, J. R. Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (32), 2183–2191.

(30) Kashkush, K.; Feldman, M.; Levy, A. A. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nat. Genet.* **2003**, *33*, 102–106.

(31) Ito, H.; Yoshida, T.; Tsukahara, S.; Kawabe, A. Evolution of the ONSEN retrotransposon family activated upon heat stress in Brassicaceae. *Gene* **2013**, *518* (2), 256–261.

(32) Baccarelli, A.; Bollati, V. Epigenetics and environmental chemicals. *Curr. Opin. Pediatr.* **2009**, *21* (2), 243–251.

(33) Terry, M. B.; Delgado-Cruzata, L.; Vin-Raviv, N.; Wu, H. C.; Santella, R. M. DNA methylation in white blood cells: Association with risk factors in epidemiologic studies. *Epigenetics* **2011**, *6* (7), 828–837.

(34) Manifava, M.; Thuring, J. W. J. F.; Lim, Z.-Y.; Packman, L.; Holmes, A. B.; Ktistakis, N. T. Differential binding of traffic-related proteins to phosphatidic acid- or phosphatidylinositol (4,5)- bisphosphate-coupled affinity reagents. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 8987–8994.

(35) Wang, X.; Devaiah, S. P.; Zhang, W.; Welti, R. Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog. Lipid Res.* **2006**, *45* (3), 250–278.

(36) Shin, J.; Loewen, C. Putting the pH into phosphatidic acid signaling. *BMC Biol.* **2011**, *9*, 85.

(37) Takiguchi, M.; Achanzar, W. E.; Qu, W.; Li, G.; Waalkes, M. P. Effects of cadmium on DNA-(cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Exp. Cell Res.* **2003**, *286* (2), 355–365.

Résumé

En milieu naturel, évaluer l'effet des contaminants sur les organismes aquatiques s'avère difficile dû aux nombreux facteurs (température, oxygénation, prédation, parasitisme, ...) agissant sur les organismes. Le but de ces travaux de thèse était alors de tester la possibilité de détecter et hiérarchiser les effets de divers facteurs naturels et anthropiques sur des individus prélevés *in situ*. Le modèle d'étude utilisé était l'anguille Européenne (*Anguilla anguilla*) et Américaine (*Anguilla rostrata*). Pour appréhender les effets *in situ* des polluants, nous avons tenté d'identifier des gènes pour lesquels le niveau de transcription était spécifiquement corrélé à un polluant ou un facteur naturel mesuré sur le terrain au moyen de deux outils transcriptomique : le séquençage haut débit et la puce à ADN. Les profils transcriptomiques obtenus à partir des foies d'anguilles directement prélevées sur le terrain ont été comparés dans un deuxième temps, à ceux obtenus à partir d'individus exposés au laboratoire à divers facteurs naturels et anthropiques de façon séparée. La comparaison de ces profils a montré une différence notable des réponses des individus exposés en laboratoire et ceux prélevés *in situ*, soulevant un effet non négligeable du stress induit par la captivité en mésocosme. La réalisation d'une étude similaire en utilisant la nageoire caudale comme méthode non-invasive s'est révélée pertinente dans la capacité de cet organe à discriminer les différentes conditions expérimentales et de terrain. L'utilisation de la puce sur des gonades d'anguilles Européennes maturées artificiellement a indiqué que la pollution pourrait affecter les capacités de reproduction des futurs géniteurs et contribuer alors au déclin massif de cette espèce observé depuis les dernières décennies.

Mots clés : *Anguilles d'Atlantique, transcriptomique, hydrosystèmes, Saint-Laurent, Gironde, multi-pollution.*

Summary

In the natural environment, assessing the impact of contaminants on aquatic organisms remains difficult due to many factors (temperature, oxygenation, predation, parasitism, ...) acting on organisms. The purpose of this thesis was then to test the ability to detect and prioritize the effects of various natural and anthropogenic factors on individuals sampled in the natural environment. The models used were the European (*Anguilla anguilla*) and American (*Anguilla rostrata*) eels. To understand the effects of pollutants *in situ*, we attempted to identify genes for which the transcription level was correlated to a specific pollutant or a natural factor measured in the field with two transcriptomic tools: high-throughput sequencing and DNA microarray. Transcriptomic profiles obtained from livers of eels taken directly from the field were compared in a second phase to those obtained from individuals exposed in the laboratory to various natural and anthropogenic factors separately. Comparison of these profiles showed a significant difference in responses of individuals exposed in the laboratory and those collected in the field, showing a significant effect induced by captivity mesocosm stress. Conducting a similar study using the tail fin as a non-invasive method was relevant for the ability of this tissue to discriminate different experimental and field conditions. Finally, the use of the microarray on the gonads of artificially matured European eels indicated that the pollution could affect the reproductive capabilities of future spawners and contribute to massive decline of this species observed in last decades.

Key words: *Atlantic eels, transcriptomic, hydrosystems, Saint-Laurent, Gironde, multi-pollution context.*